

BIO-42



Universidade Eduardo Mondlane

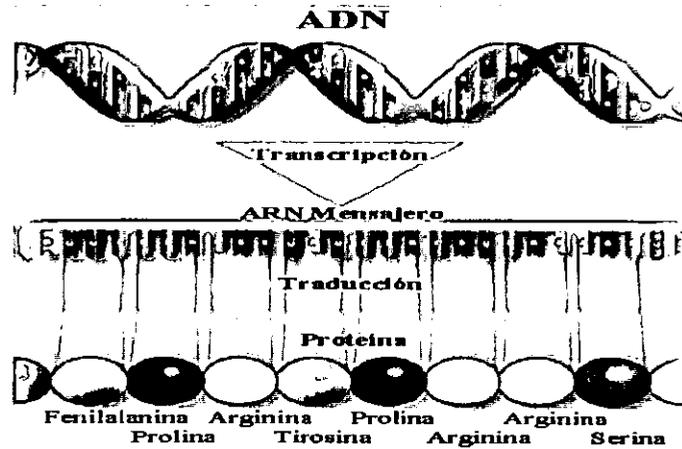


Faculdade de Ciência

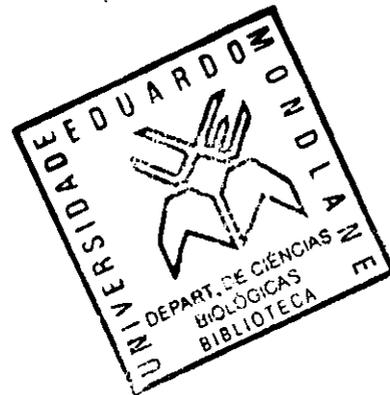
Departamento de Ciências biológicas

CBUEM

Tema: Treinamento em Técnicas de Biologia Molecular em uso no Centro de Biotecnologia da UEM (Estágio)



Autor : Kenyssonny Isaque Vasco Varela



1



Universidade Eduardo Mondlane

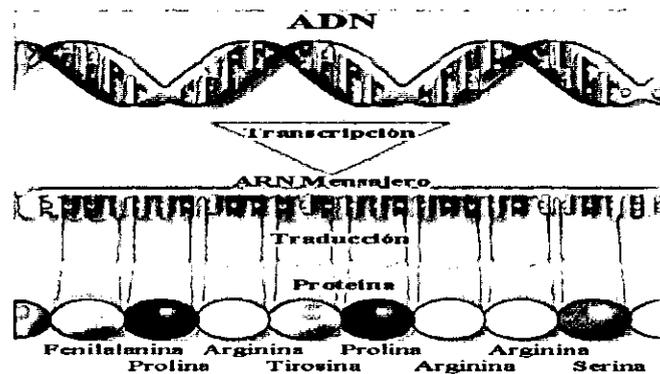


Faculdade de Ciência

Departamento de Ciências Biológicas

CBUEM

**Tema: Treinamento em Técnicas de Biologia
Molecular em uso no Centro de Biotecnologia da
UEM (Estágio)**



Autor : Kenyssonny Isaque Vasco Varela

Supervisores: Professor Doutor Tomás de La Fé

Professor Doutor Joaquim Saide

Orientadores do estágio: Professor Doutor Tomás de La Fé

Eng^a Ivone Muocha



Maputo, Dezembro de 2006

Agradecimentos

A vida segue vários rumos e é feita de várias dificuldades. Apesar de todas as amarguras e fracassos, existem pessoas que merecem algum reconhecimento.

Endereço o meu sincero agradecimento e reconhecimento, aos meus supervisores; Professor Doutor Tomás de La Fé e Professor Doutor Joaquim Saide, pela ajuda técnica na concessão deste projecto, a Engenheira Ivone Muocha e a dr^a Olívia Pedro pelo seu apoio, agradeço ainda aos meus irmãos; Renato, Helder, Alvaro, Rodolfo, Fátima, Emuna e em especial a minha irmã Maria Alexandrina Domingos Varela por todo o apoio prestado durante a carreira e sobretudo por ter acreditado que eu era capaz. Agradeço a todos os meus primos e sobrinhos: em especial ao Nobre de Jesus Varela Canhanga por tudo, não se esquecendo daquelas noites na cozinha da R2 que foram momentos chaves para chegar a este projecto. Aos meus tios e aos meus amigos Padre Ricardo Regonosi, Silvestre, Ângelo, Paula, Mulaveia, Violante, Nina, Sónia e Martins pelo companheirismo. A minha namorada Esvénia muito obrigado pelo apoio moral em momentos críticos durante a formação, agradeço ainda a todos funcionários do DCB e a todos aqueles cínicos que mesmo prejudicando, endereço o meu singelo agradecimento e espero continuar a ter bênção divina para alcançar outros patamares na arena científica.

Declaração de Honra

Declaro por minha honra, sinceridade e verdade que este trabalho é da minha própria autoria e criatividade, resultado de investigação e estágio no centro de biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane. O presente trabalho nunca foi submetido para aquisição de qualquer outro grau académico, e por ser verdade vem por mim assinado.

Kenyssony Isaque Vasco Varela

(Kenyssony Isaque Vasco Varela)

Maputo, Dezembro de 2006

Dedicatória

É com muito orgulho e prazer que dedico este trabalho aos meus pais, a minha querida mãe Filipa Domingos Varela e ao meu falecido pai Isaque Vasco Varela. Mãe tenho este trabalho como um dos meus maiores presentes da Vida e espero um dia voltar a dar-lhe um outro presente enquanto termos vida, pois o maior prazer que tenho da vida é poder oferecer-lhe presentes. Pai, apesar de não estar entre nós, quero acreditar que se estivesse receberia este trabalho como uma das maiores realizações como pai. São tantas as coisas que vos quero dizer, mas tenho medo de as não poder fazer, por isso gostaria que se sentissem bem com este presente.

Glossário dos Termos em Abreviatura

A- Adenina

ADN – Ácido desoxirribonucleico

APS – Amoniapersulfato

ARN – Ácido ribonucleico

C – Citosina

CBUEM – Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane

CTAB – Brometo de Acetiltrimetilamonium

EDTA – Etilenodiaminatetracético

G – Guanina

ITS – Espaciador Interno Transcrito

nm- Nanómetros

OGM – Organismo Geneticamente Modificado

pb- pares de base

PCR – Reacção em Cadéia da Polimerase

Pm – Peso Molecular

RFLPs – Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição

rpm- Rotação por Minuto

SDS – Dodecilsulfato de Sódio

STR – Repetições Curtas em Tandem

T – Timina

TAE – Tris-Acetato Etilenodiaminatetracético

TBE – Tris – Borato Etilenodiaminatetracético

TEMED – Tetrametiletilenodiamino

Tris EDTA – Tris – Etilenodiaminatetracético

Tris-Hcl – Tris ácido clorídrico

Resumo

O presente trabalho de estágio realizou-se entre os meses de Fevereiro e Setembro do ano 2006, consistiu na aprendizagem da aplicação dos marcadores moleculares (ITS e STR), que resultaram na distinção genética de ecotipos de *Vigna unguiculata*, e em estudos de frequências alelicas na população Moçambicana.

O trabalho está constituído por cinco partes: aplicação de diferentes protocolos de extracção de ADN; Quantificação do ADN (o que permitiu seleccionar amostras de ADN de maior qualidade); Reciclagem de géis de agarose e seu tampão TAE 1X (contribuindo para economizar os reagentes e reduzir os custos de compra dos reagentes); Estudo alelico de população humana baseados em marcadores STR; Estudo de ITS acopladas a RFLPs; Detecção de modificação genética em plantas (baseado no pressuposto de que a modificação foi introduzida com base no promotor CaMV35S).

Foi estabelecido numa fase preliminar o protocolo de extracção de ADN e método de detecção dos GOMO (plantas). O gel de agarose foi reciclado três vezes enquanto o tampão TAE 1X foi reciclado seis vezes.

Lista de anexos

Anexo I

Tabelas

1. -Cronograma do Estágio
2. Concentração de agarose e alcance de resolução em pb
3. Quantidades parciais de reagentes e o volume final do mix para análise dos STRs
4. Protocolo de amplificação dos STRs
5. Componentes e volume da solução "Stock" e do gel de poliacrilamida
6. Quantidades de reagente e volume de reacção para ITS 1.
7. Digestão total por *EcoRI* do ADN amplificado para ITS1
8. Digestão total por *Hind III* do ADN amplificado para ITS1
9. Digestão total por *BamHI* do ADN amplificado para ITS1
10. Protocolo de amplificação do ITS1
11. Polimorfismos ITS1 com RFLP por 3 enzimas diferentes
12. Dados de quantificação espectrofométrica do ADN
13. Componentes reacionais para detecção de OGMs
14. Protocolo de amplificação da região CaMV 35S

Anexo II

Métodos de Extração do ADN Ensaçados Durante o Período do Estágio

Anexo III

Amostragem

Anexo IV

Material Utilizado no Estágio

Anexo V

Figuras

1. Primeiro gel de agarose antes da reciclagem
2. Primeira reciclagem do gel de agarose
3. Segunda reciclagem do gel de agarose
4. Terceira reciclagem do gel de agarose
5. ITS, amplificado mas não digerido.
6. Alelos do Locus CSF1PO, estudados por STR simplex
7. Alelos do Locus F13B, estudados por STR simplex
8. Alelos do Locus HPRTB, estudados por STR simplex

Anexo VI

Algumas soluções usadas na extração de ADN e na preparação de géis.

Índice

Contéudo	Pag
1. Localização da Instituição do Estágio	1
1.1. Apoio Concedido pela Unidade do Estágio	1
1.2. Problema e Justificação do Estágio.....	1
2. Introdução	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. História e Estrutura do ADN.....	5
3.2. Replicação	7
3.3. A PCR (Reacção em Cadeia da Polimerase).....	9
3.4. Marcadores Moleculares.....	10
3.4.1. STRs, (Microsatélites ou Repetições Curtas em Tandem).....	10
3.4.2. ITS (Espaciador Interno Transcrito), RFLPs (Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição) e Enzimas de restrição.....	11
3.5. Organismos geneticamente modificados (Plantas)	14
3.6. Electroforese	16
3.6.1. Variações nos tipos de electroforese	16
3.6.2. Electroforese em géis	16
3.6.3. Electroforese em gel de agarose	17
3.7. Electroforese em géis de Poliacrilamida	18
3.8. Tampões aplicados na electroforese.....	21
3.9. Factores que influenciam a electroforese	21
3.9.1. O campo eléctrico	21
3.9.2. A amostra	22
3.9.3. O tampão	23
3.9.4. O meio de suporte.....	24
3.9.5. Função de alguns reagentes usados no processo de extracção do ADN	24
4. Objectivos	25
4.1. Geral	25
4.2. Específicos	25
5. Material e Métodos Utilizados no Estágio	25
5.1. Materiais.....	25

5.2. Metodologia	26
5.2.1. Quantificação do ADN extraído pelo método II.I do anexo II.	26
5.3. Reciclagem do gel de agarose e tampão TAE 1X	27
5.4. Amplificação do ADN por PCR para estudo dos STR simplex	28
5.5. Preparação do gel de Poliacrilamida	29
5.5.1. Corrida electroforetica do produto de Amplificação dos STRs em gel de poliacrilamida	30
5.5.2. Revelação do gel de poliacrilamida	31
5.6. ITS na distinção dos ecotipos de Vigna unguiculata	31
5.7. Detecção de Modificação Genética de Plantas	32
6. Resultados	32
6.1. Quantificação	32
6.2. Reciclagem de géis de agarose	32
6.3. STR	33
6.4. ITS 1 na distinção de ecotipos de Vigna unguiculata	33
6.5. Detecção de OGMs (Plantas)	33
7. Discussão	33
7.1. Quantificação	33
7.2. Reciclagem do agarose e do tampão TAE 1X	34
7.3. Marcadores ITS, usado na distinção de ecotipos de Vigna unguiculata	34
7.4. Detecção de OGM (Plantas)	35
8. Conclusão	35
9. Recomendações	36
10. Bibliografia	38
Anexos	46

1. Localização da Instituição do Estágio

O estágio foi realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (CBUEM). Este centro tem a sua sede e principais infra-estruturas laboratoriais na Faculdade de Veterinária da UEM, sita na Avenida de Moçambique, quilometro 1,5. Esta unidade de estágio é uma instituição autónoma da UEM e serve a quatro faculdades, nomeadamente: Agronomia, Ciências (Departamento de Biologia), Medicina e Veterinária. O CBUEM é uma unidade orgânica vocacionada na investigação, formação em Biologia Molecular (Biotecnologia), e prestação de serviços. O Centro desenvolve actividades de pesquisa em várias áreas como: a Epidemiologia, Genética de Populações e Meio Ambiente.

O estágio foi orientado pelo Professor Doutor Tomás de La Fé, assessor no Departamento de Orientação e Supervisão Pedagógica na Direcção Pedagógica da UEM e, pela Engenheira Ivone Muocha, investigadora da Faculdade de Agronomia e colaboradora no CBUEM. O cronograma do estágio apresenta-se na tabela 1 do anexo I.

1.1. Apoio Concedido pela Unidade do Estágio

Durante o período do estágio, o CBUEM, ofereceu uma enorme ajuda facultando a oportunidade de trabalhar com vários investigadores, o que permitiu uma familiarização aprofundada em relação ao uso dos equipamentos e conhecimento dos riscos em termos de saúde que podem advir da utilização contínua de alguns reagentes. Visto que são escassas as bibliografias que abordam assuntos sobre o manuseio dos reagentes dentro do laboratório.

1.2. Problema e Justificação do Estágio

O estudo das Técnicas de Biologia Molecular é fundamental em Moçambique, embora este seja um país com poucos recursos para fazer face a grande demanda monetária necessária para equipamentos e reagentes. Estas técnicas permitem diagnosticar a origem e a presença de várias doenças, assim como detectar a origem de vários produtos alimentares (OGMs), contribuindo desse modo, para a tomada de decisões, como por exemplo a comercialização e consumo destes.

Além disso, permite seleccionar espécies cultivares que apresentem características genéticas, permitindo desse modo diferenciar num espaço de tempo curto uma variedade da outra.

2. Introdução

As técnicas da análise dos polimorfismos do ADN são relativamente simples e comuns a toda Biologia Molecular. Estas técnicas deduzem-se do modelo da dupla hélice do ADN, proposto em 1953 por Watson e Crick, que marcam o desenvolvimento da Biologia Molecular como ciência (Jeffreys, 1985).

Na década 60, a aplicação da electroforese no estudo de proteínas permitiram a análise da variabilidade nos indivíduos através de polimorfismo de expressão como os de proteínas séricas e enzimas eritrocitárias (Jarreta, 1999).

Muito recentemente, as análises genéticas estavam fundamentalmente baseadas em estudos de marcadores genéticos convencionais (antígenos eritrocitários e leucocitários, proteínas séricas e enzimas eritrocitárias). Nessa fase conseguiu-se um avanço surpreendente no campo da genética, baseado na descoberta das regiões hipervariáveis do ADN (Jarreta 1999, Jeffreys 1985). A partir desse momento a utilidade dos polimorfismos clássicos tem diminuindo a medida que se generaliza o estudo desses novos marcadores, muito mais informativos, principalmente devido a grande variabilidade química do ADN assim como a alta sensibilidade das técnicas que se utilizam (Jarreta 1999, Jeffreys 1985).

Na década 80, os estudos genéticos adquiriram um enfoque diferente devido a possibilidade da análise de sequências nucleotídicas, e quando pela primeira vez faz-se a interpretação da variabilidade genética através da análise do próprio material genético, isto é, do ADN e não a partir dos produtos de expressão que este codifica (Jarreta, 1999).

A análise do ADN apresenta importantes vantagens sobre as proteínas, por ser mais informativo, devido a elevada heterozigose que apresenta, além de ser a molécula mais resistente a degradação que as proteínas e, permitir a análise em amostras com ADN altamente degradado (Jeffreys, 1985). Outro aspecto não menos importante é a informação genética que se pode obter a partir de qualquer fluido ou tecido orgânico (sangue, saliva, sémen, osso, partes de uma planta sementes etc.), tanto que a análise dos marcadores proteicos ficam restringidos ao estudo nas células onde se expressam (Jeffreys, 1985).

A utilização dos polimorfismos no campo da Genética Molecular tem tido uma enorme difusão no campo da investigação biológica, relacionada com o estudo de paternidade, identificação de indivíduos, diagnósticos clínicos etc. (Edwards *et al.*, 1991). Os polimorfismos do ADN hipervariáveis possuem tal capacidade identificadora que hoje são considerados o instrumento básico e de eleição na caracterização genética de populações.

O curso de Biologia da Universidade Eduardo Mondlane (UEM) tem dentro dos seus ramos a aplicação da biotecnologia (Biologia Aplicada), portanto, é interessante que os estudantes que seguem este ramo adquiram determinadas habilidades na área de genética molecular que possam ser utilizadas uma vez formados. Neste contexto, justifica-se a realização do presente trabalho de estágio em genética molecular no Centro de Biotecnologia da UEM, onde se desenvolvem projectos de investigação e são aplicadas estas inovadoras técnicas nas suas diversas formas.

Com a realização deste estágio pretendeu-se adquirir uma série de habilidades relacionadas com diferentes métodos de extracção de ADN a partir do sangue humano e de diferentes partes de plantas, assim como a quantificação e detecção do ADN extraído destas espécies. Outro elemento de interesse dentro do estágio foi a utilização e aplicação de alguns marcadores moleculares através da técnica de PCR (Reacção em Cadeia da Polímerase) e electroforese.

Dentro das técnicas utilizadas no Centro de Biotecnologia na caracterização de populações humanas e de plantas como feijão Nhembá (*Vigna umguiculata*), se encontram a aplicação dos STR (Repetições Curtas em Tandem), RFLPs (Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição), e ITS (Espaciador Interno Transcrito).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. História e Estrutura do ADN

Na década dos anos 1944, não se imaginava que o ácido desoxirribonucleico (ADN) poderia ser a molécula que estruturalmente teria a capacidade de garantir a transmissão das características hereditárias de célula para célula e de geração pós geração (Delvin 2002, Griffiths *et al.*, 1999, Stryer 1996, Voet e Voet 1995, Gardner e Snustad 1987). A simplicidade química com que se apresenta o ADN, não permitia pensar que este teria a capacidade de armazenar a informação genética dos seres vivos, responsável para as variadas funções (Griffiths, 1998). Questionava-se a capacidade desta molécula, constituída por Adenina, Guanina, Citosina e Timina, poder armazenar muita informação e suportar vários processos. Porém, actualmente sabe-se que o ADN possui a capacidade de autoduplicação (replicação), transferência da informação (transcrição) e expressão da informação (tradução) (Thompson *et al.*, 1993).

A era moderna da biologia molecular teve o seu início em 1953, quando James D. Watson e Francis H. C. Crick deduziram a estrutura da dupla hélice do ADN. Com a elucidação deste modelo, baseado nos estudos existentes sobre a transformação do ADN, ficou claramente demonstrado como o ADN poderia duplicar-se e transmitir a informação genética de geração pós geração. Actualmente os estudos de biologia molecular em evidência para análises com técnicas recentes são baseados no estudo do ADN (Reaver e Hedrick 1997, Raven *et al.*, 1996, Darnell *et al.*, 1993).

Embora a estrutura do ADN não fosse conhecida, os blocos estruturais dos quais se constitui já eram conhecidos a bastante tempo. As componentes do arcabouço do ADN são o grupo fosfato e a pentose desoxirribose, que a eles se juntam as bases azotadas para formar um monómero chamado nucleotídeo que contém uma base nitrogenada diferente (Griffiths *et al.*, 1999, Stryer 1996). A Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C), ou Timina (T), bases essas responsáveis pelo transporte da informação genética (Delvin 2002, Griffiths *et al.*, 1999, Griffiths 1998, Stryer 1996).

O ADN é formado por duas cadeias nucleotídicas com giro para a direita que formam uma dupla hélice em torno de um eixo central (Stryer 1996, Branden e Tooze 1991). A dupla hélice é unida

por meio de pontes de hidrogénio que se estabelecem entre os pares de bases que a integram, e pelas interações hidrofóbicas adjacentes, estabelecidas entre os pares de bases, onde A e T estão ligadas por duas pontes de Hidrogénio, G e C por três. Como efeito da diferença do número de pontes de hidrogénio formados entre as bases, o par T-A é menos estável que o G-C (Voet e Voet, 1995).

As duas hélices correm em sentidos opostos, são antiparalelas, diz-se que elas têm polaridade inversa, uma é chamada de filamento 5' → 3' e a outra, 3' → 5' significando que em cada hélice os nucleotídeos são unidos de forma adjacente por ligações fosfodiéster (Griffiths *et al.*, 1998, Horton *et al.*, 1996).

A forma predominante do ADN é a dupla hélice, com duas cadeias polinucleotídicas independentes e enroladas uma ao redor da outra. Nesta forma comum do ADN, os anéis de purina e pirimidina de cada cadeia estão empilhados no interior da hélice em cada 0,34 nm (3,4 Å), com o plano dos seus anéis quase perpendicular ao seu eixo. A cada 3,4 nm (34 Å) a hélice dá uma volta completa, ou seja, essa volta contém 10 pares de base (Weaver e Hedrick 1997, Darnell *et al.*, 1993).

Os vários modelos da dupla hélice apresentado por Watson e Crick tiveram grande contributo de Erwin Chargaff que em 1950 estudando a composição das bases do ADN de várias fontes revelou que o conteúdo de purinas sempre era igual aos das pirimidinas (Weaver e Hedrick 1997, Singer e Berg 1993, Gardner e Snustad 1987).

Posteriormente Chargaff descobriu que as quantidades de timina e adenina eram similares, assim como as de citosina e guanina, estas relações ficaram conhecidas como regras de Chargaff (Weaver e Hedrick, 1997).

A informação genética de todas as células está codificada nas diferentes combinações e na ordem dos nucleotídeos que compõem seu ADN. Esta informação é inicialmente expressa por meio de um ácido nucléico semelhante ao ADN, o ácido ribonucleico (ARN). Este ácido dirige a produção das proteínas codificadas no ADN original (Griffiths *et al.*, 1999, Singer e Berg 1993).

Em última instância, o fenotipo de um organismo encontra-se determinado pelo seu número e variedades de proteínas expressas à partir do seu ADN. O resumo das relações informacionais entre as moléculas genéticas, ADN, ARN e proteínas representam o dogma central da genética (ADN-RNA- proteínas), envolvendo a replicação transcrição e tradução (Osório e Robinson 2001, Singer e Berg 1993).

3.2. Replicação

Watson e Crick perceberam que o pareamento complementar de bases é o fundamento da fidelidade da replicação do ADN. Esta percepção mostra que a característica fundamental do ADN é a capacidade de armazenar e transmitir a informação genética à progénies filhas celulares (McKee e McKee 1999, Griffiths *et al.*, 1998).

Na tentativa de explicar o processo pelo qual se dá a replicação do ADN, foram desenhados três modelos teóricos: o da replicação conservativa, dispersiva e semi-conservativa. Em 1958, estudos realizados por Meselson e Stahl demonstraram que a forma correcta de replicação é a semi-conservativa, proposta por Watson e Crick (Horton *et al.*, 2002, Gardner e Snustad 1987).

Na síntese *in vivo* do ADN são necessárias várias enzimas (ADN polimerase I, II, III, Helicases, primase, ligase), proteína de ligação do ADN (SSB), e iniciadores (*primer*) assim como uma fita molde de ADN (Singer e Berg, 1993).

A ADN polimerase catalisa a replicação do ADN e também participa na reparação do ADN no início da formação do novo fragmento. Para além do iniciador da fita molde e das enzimas a ADN polimerase necessita de quatro desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Horton *et al.*, 2002, Osório e Robinson 2001).

Nos organismos procariotas, a replicação inicia-se em um único ponto, enquanto nos eucariotas pode iniciar-se ao mesmo tempo e em vários locais ou origens (cada um separando-se do outro em aproximadamente 20 kpb ao longo dos cromossomas), podendo ser unidireccional ou bidireccional (Singer e Berg, 1993). O ponto onde se origina é denominado forquilha, garfo ou ponto crescente de replicação (Osório e Robinson, 2001).

Dois processos básicos acontecem na replicação, o rompimento das pontes de hidrogénio das cadeias da dupla hélice por acção das enzimas helicases, utilizando energia proveniente da hidrólise do ATP a ADP e formação das cadeias complementares pela acção da ADN polimerase (Horton *et al.*, 2002, Singer e Berg 1993, Gardner e Snustad 1987). As rompidas pontes de hidrogénio do ADN são estabilizadas através da proteína de ligação (SSB) que se liga as cadeias simples estabilizando o ADN de dupla cadeia desenrolado, permitindo um contínuo desenrolamento pelas Helicases (Singer e Berg 1993, Wilson e Goulding 1993).

Como não é possível a extensão do ADN na direcção 3' a 5', pelo facto das cadeias de ADN serem antiparalelas e da replicação apenas se dar na direcção 5' a 3' em ambas as cadeias; a síntese de uma das fitas é contínua, fita condutora (*Leading strand*), e da outra é descontínua, fita retardada (*lagging strand*) (Horton *et al.*, 2002, Raven *et al.*, 1996).

A síntese da fita retardada necessita de múltiplos iniciadores, o que se manifesta pela presença transitória de vários fragmentos curtos de ADN, chamados de fragmentos de Okazaki que possuem entre 1000 e 2000 nucleótidos de comprimento nos procariontes e entre 100 a 200 nos eucariotes que são unidos pelas ligases quando o ADN se movimenta. A síntese da fita tardia é feita no sentido inverso ao da forquilha de replicação enquanto a síntese da fita contínua acontece na direcção do garfo de replicação, mas ambas as fitas são sintetizadas na direcção 5' a 3' (Campos, 1999, Griffiths *et al.*, 1998, Raven *et al.*, 1996).

O modelo exacto de replicação do ADN bicatenario é o semi-conservativo (não são conhecidas formas alternativas de replicação do tipo dispersivo e conservativo no ADN bicatenario), dado que são originadas duas fitas de ADN, cada uma composta por uma fita de ADN original e outra complementar, significando que uma fita é velha (ou do ADN mãe) e a outra nova (do ADN filho) (Singer e Berg 1993, Gardner e Snustad 1987).

Os estudos feitos com vista na elucidação da estrutura do ADN e posterior tentativa explicativa de como este ADN transmitia a informação genética, assim como a necessidade de análises dos produtos de expressão do ADN em células e tecidos, de plantas e animais, conduziram a

descoberta de técnicas como a electroforese, PCR e outras, bem como o desenvolvimento de elementos de análise que permitissem o estudo dos ácidos nucleicos nas suas diversas formas; os marcadores moleculares.

3.3. A PCR (Reacção em Cadeia da Polimerase)

O desenvolvimento da técnica reacção em cadeia da polimerase (PCR) deu-se em meados dos anos oitenta, por Kary Mullis (Videira 2001, Tamarin 1996). Esta técnica baseia-se no processo de replicação do ADN que ocorre *in vivo* (Lima e Mota 2003, Branden e Tooze 1991).

A PCR necessita essencialmente da presença da sequência de ADN que se pretende estudar, de um par de *primers* (*Forward* e *Reverse*), de nucleótidos e de uma enzima como a *Taq* polimerase (Lima e Mota 2003, Darbre 1999). Esta técnica permite um aumento exponencial de uma sequência do ADN por extensão simultânea através dos *primers* baseada na amplificação enzimática *in vitro* (Latchman 1997, Branden e Tooze 1991).

As reacções de amplificação do ADN são executadas em três etapas fundamentais, a **desnaturação do ADN** alvo (separação da dupla hélice) com temperatura superior à 90°C, **associação dos iniciadores** (*primers*) por ligações de hidrogénio ao ADN alvo em cadeia simples acompanhada por abaixamento da temperatura entre 50 à 70 °C (Lima e Mota 2003).

A temperatura a usar depende da percentagem de G-C, uma vez que os oligonucleótidos iniciadores são adicionados em grande excesso, a probabilidade de se associarem ao local alvo é superior a do re-emparelhamento das cadeias complementares, finalmente a **extensão dos iniciadores** através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela ADN polimerase. Esta amplificação dá-se em direcções opostas a partir de cada um dos iniciadores, na presença dos 4 dNTPs e de Mg^{2+} , num tampão adequado ao processo. A reacção de amplificação permite obter um aumento de um milhão de vezes dentro de 25 ciclos (Lima e Mota 2003, Videira 2001, Erlich 1989).

A utilização da PCR apresenta pequenos problemas. A *Taq* polimerase não tem a capacidade de correcção de erros comuns a ADN polimerase (actividade exonuclese 3' à 5') e introduz alguns

erros embora com uma frequência baixa. Um outro problema da PCR é o da contaminação devido a sensibilidade da técnica; se a reacção da PCR for contaminada com um ADN estranho, este pode emparelhar com os *primers* e ser amplificado (Videira 2001, Erlich 1989).

A PCR é a técnica mais usada para o estudo do ADN (Pinheiro, 2004). Com a PCR pode-se analisar qualquer ADN que esteja presente, mesmo em pouca quantidade (Pinheiro 2004, Tozzini *et al.*, 2000, Darbre 1999, Latchman 1997, Tamarim 1996).

3.4. Marcadores Moleculares

Actualmente existe um grande número de marcadores moleculares baseados em PCR. Um marcador molecular pode ser definido como o locus genómico, relevante e específico que em virtude da sua presença, distingue de maneira característica e inequívoca o segmento cromossómico com o qual se identifica as regiões que envolvem as extremidades 5' e 3'. São aplicados como técnicas para caracterizar determinados segmentos de ADN, genómico ou não genómico que representam uma característica particular num individuo ou de uma população e que permite caracteriza-la (Barcaccia *et al.*, 2000).

O ADN nuclear proporciona muita e mais informação para análises moleculares, devido a quantidade de sistemas polimórficos que podem ser estudados, como por exemplo, os microsatélites STR (Repetições Curtas em Tandem) (Jarreta, 1999), regiões promotoras como a CaMV35S aplicada no diagnóstico de modificações genéticas em plantas (Tozzini *et al.*, 2000), ITS (Internal Transcribed Spacer), como ferramenta potencial para estudos moleculares da sistemática (Boyer *et al.*, 2001) e RFLPs utilizados na caracterização genética de plantas e varias espécies de microrganismos (Konstantinov *et al.*, 2005).

3.4.1. STRs, (Microsatélites ou Repetições Curtas em Tandem)

Os Loci STRs, podem definir-se como pequenas sequências de regiões de ADN repetitivo, que se encontram repartidos ao longo de todo o genoma, com menos de 350 pares de base (pb) e, consistem em sequências repetidas tandemicamente (AGAT, AGAT, AGAT, etc.) com tipicamente 1 à 6, 2 à 5 ou 2 à 7 pb de comprimento (Pinheiro 2004, Sánchez-Diz *et al.*, 2003,

Alonso Alonso 1999, Poltl *et al.*, 1998). No genoma humano pode-se encontrar em media um microsatélite em cada 5000 ou 6000-10000 pb, e pelo facto de serem co-dominantemente herdados podem ser usados na identificação humana (Pinheiro 2004, Belgrader *et al.*, 2001, Alonso Alonso 1999, Poltl *et al.*, 1998).

Calcula-se que o genoma humano contém aproximadamente 500.000 STRs, onde 6.000 à 10.000 são triméricos ou tetraméricos (Pinheiro, 2004). Um grande número dos loci STR apresenta um elevado grau de polimorfismo genético de comprimento, cuja base molecular consiste na variação do número de unidades de repetição (Alonso Alonso 1999, Brown 1989). Os STRs também são ligados ao cromossoma X, Y, e até são autossomicos (Alonso Alonso, 1999).

Pelo facto do tamanho dos alelos STR serem geralmente menores que 350 pb, são susceptíveis de análise mediante técnicas de amplificação genica PCR (Reacção em Cadeia da Polímerase) (Alonso Alonso, 1999), que oferecem uma grande sensibilidade, permitindo analisar amostras com pouca quantidade de ADN e dando vantagem de determinar o tamanho de alelos com uma grande precisão (resolução de apenas uma base), bem como possibilitar a análise simultânea de distintos STR mediante o processo conhecido por PCR-multiplex, contudo não deixam de permitir a análise por PCR-simplex, possibilitando o estudo genético no campo da genética de populações humanas, identificação genética humana, diagnóstico de enfermidade de base genética (distorfia miotónica, fibrose sistica etc.) (Alonso Alonso, 1999).

3.4.2. ITS (Espaciador Interno Transcrito), RFLPs (Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição) e Enzimas de restrição

Os ITS (Espaciador Interno Transcrito): são sequências localizadas no interior dos genes eucarioticos do ARN ribossomal (rRNA), entre as regiões codantes 18s e 5.8s do rRNA ribossomal. Esta região é chamada (ITS1) e entre as regiões codantes 5.8s e 25s denominada (ITS2) (Souframanien *et al.*, 2003, Boyer *et al.*, 2001, Ajay *et al.*, 2000).

Estudos de variação de locais de restrição no ADN ribossomal (rADN) em populações de plantas, têm mostrado que as regiões codantes são conservadas e, estas mesmas regiões espaciadoras também são variáveis. As sequências espaciadoras apresentam um elevado grau de

desenvolvimento progressivo e estão presentes em todos os genes conhecidos do rRNA nuclear dos eucariotas (Souframanien *et al.*, 2003).

Os ITS1 e ITS2 apresentam variações de sequência e são ferramentas proveitosas para análises filogenéticas entre várias espécies ou entre populações dentro da mesma espécie (Ajay *et al.*, 2000).

O espaciador interno transcrito do rADN é um dos marcadores moleculares mais extensivamente sequenciados. A região faz parte do rADN cistronico, que consiste de 18s, ITS1, 5.8s, ITS2 e 26s, estando presente em mais de 100 cópias em muitos eucariotas (Won e Renner, 2005). Os ITS1 e ITS2 não são equivalentes como estruturas e nem iguais, se bem que eles algumas vezes são convergentes. O ITS1 é desenvolvido a partir de um espaciador intergenico enquanto o ITS2 é desenvolvido a partir de uma expansão do segmento da subunidade maior no rADN. Estas diferenças significativas na trajetória evolutiva dos ITS podem ser esperadas nas progenies seguintes de um determinado organismo (Won e Renner, 2005).

Nos genomas de plantas estão presentes 1000 cópias e são localizadas em um ou vários loci, distribuidos em um ou vários cromossomas. Os comprimentos das regiões ITS das sementes de plantas com flor são altamente uniformes. Em contraste, o ITS nas plantas de sementes sem flor mostram muitas variações. Especialmente, o comprimento das regiões ITS1 que variam de 630 a 3125 bp é notavelmente muito instável em relação a estas em plantas com flores (Won e Renner, 2005).

Segundo Silva *et al.*, 2006, as regiões ITS são altamente conservadas e conseqüentemente bons marcadores moleculares em estudos de diagnósticos, aplicando a PCR-RFLP para estas regiões.

O estudo dos ITS tem-se associado às enzimas de restrição (Silva *et al.*, 2006) e, a biologia molecular é dependente de uma grande quantidade de enzimas isoladas e caracterizadas, que podem cortar, degradar, modificar e sintetizar moléculas de ADN e ARN. Essas são conhecidas como enzimas de restrição ou endonucleases de restrição e ADN polimerases (Herklotz 2003, Darbre 1999).

As endonucleases de restrição são enzimas bacterianas que em vivo servem para proteger o ADN das bactérias por degradação de qualquer molécula de ADN estranha invasora (frequentemente ADN viral) (Horton *et al.*, 2002, Voet e Voet 1995, Raven *et al.*, 1992). Existem três classes de enzimas de restrição, as do tipo I, II e III. As do tipo I cortam o ADN ao acaso e possivelmente a uns 1000 pb antes do local de restrição, enquanto as do tipo III cortam a uns 24 a 26 pb antes do local de restrição. Contudo, as enzimas do tipo II cortam o ADN em sítios específicos de restrição entre as sequências reconhecidas. Esta característica faz destas enzimas indispensáveis ferramentas para a manipulação do ADN (Voet e Voet, 1995).

Muitos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição possuem uma dupla simetria exacta na dupla hélice, conhecidos como palindromes; significando que são idênticas no sentido 5' para 3' em ambos os filamentos (5' G^{*}AATTC 3' e 3' CTTAA•G 5') (Horton *et al.*, 2002, Voet e Voet 1995, Thompson *et al.*, 1993).

Cada enzima de restrição reconhece palindromes perfeitos entre a dupla-fita do ADN, tipicamente constituídas por 4 à 8 nucleotídeos de comprimento com um eixo rotacional perfeito, por vezes os pontos de restrição encontram-se metilados, uma modificação feita por metilases, através da adição de grupos metil nas sequências de restrição, especificamente no grupo amino das adeninas ou na posição cinco do grupo amino da citosina (Horton *et al.*, 2002, Voet e Voet 1995).

A *Taq* ADN polimerase é uma enzima isolada da bactéria *Thermus aquaticus*. A enzima consiste de um único polipeptídeo com um peso molecular de aproximadamente 94 kDa. Ela é dependente da extremidade 5' para 3' na síntese da fita do ADN na presença dos *primers*, é termoestável o que possibilita sua aplicação nos ciclos repetidos de aquecimento e arrefecimento necessários para a reacção da PCR (Herklotz 2003, Darbre 1999 e Raven *et al.*, 1992).

As análises por RFLP (Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição) têm revelado que existem muitas diferenças na sequência do ADN entre indivíduos da mesma espécie. Os RFLPs consistem na avaliação das diferenças do peso molecular dos fragmentos que se obtêm digerindo o ADN genómico com enzimas de restrição (Barcaccia *et al.*, 2000).

Os padrões de restrição obtidos podem ser característicos ao nível da espécie ou mesmo da estirpe, dependendo do grau de heterogeneidade genômica intraespecífica (Alves *et al.*, 2003). O uso dos RFLPs e enzimas de restrição veio eliminar a dificuldade de comparação de numerosos fragmentos gerados por acção de restrição sobre o ADN genómico total (Lima e Mota, 2003).

A digestão do ADN genómico por enzimas de restrição permite diferenciar geneticamente os indivíduos pela localização dos sítios de restrição, através da produção de fragmentos de ADN com comprimentos diferentes (Bonaccorso, 2005). Tais fragmentos de restrição são, portanto, separados através da electroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, em função do seu peso molecular (Barcaccia *et al.*, 2000).

3.5. Organismos geneticamente modificados (Plantas)

Desde tempos imemoráveis, os seres humanos têm modificado o que lhes rodeia e têm seleccionado características valiosas de diferentes plantas e animais (García, 2002).

Os métodos convencionais de melhoramento de plantas e animais através de fertilização cruzada e selecção têm permitido desenvolver variedades com grupo de características particulares (García, 2002).

Nas últimas três décadas, os investigadores descobriram que o ADN podia ser modificado ou intercruzado entre plantas, animais, bactérias e outros organismos (Videira, 2001).

A chamada tecnologia do ADN recombinante permite combinar fragmentos da molecula de ADN de duas ou mais fontes diferentes ou de regiões diferentes do genoma (García, 2002).

O processo de modificar o ADN de um organismo ou de transferir ADN de um organismo ao outro mediante a engenharia genética, leva-nos a obter plantas, animais ou microrganismos geneticamente modificados (Viljoen *et al.*, 2005, García 2002).

A engenharia genética utiliza-se na produção de fármacos, terapia genica e desenvolvimento de plantas e animais transgenicos (Viljoen *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de cultivares geneticamente modificados com fins comerciais tem se aumentado rapidamente nos últimos anos. A história do desenvolvimento da engenharia genética em plantas iniciou em 1983, com as primeiras modificações de células vegetais (García, 2002).

Em 1984 são produzidas as primeiras plantas transgenicas e em 86 são levadas a cabo as primeiras provas de campo e se desenvolvem plantas resistentes a vírus (García, 2002).

Em 1988 desenvolvem-se plantas resistentes a pragas (insectos) e a herbicidas, em 89 trabalha-se na maturação de frutos e já em 1990 existiram mais de 100 provas experimentais no campo (Lima e Mota 2003, García 2002).

Em 1995 são obtidos os primeiros produtos comerciais, tomate, soja, milho e algodão (García, 2002). O transgene é sempre associado a um promotor que vai regular a sua expressão em termos temporais e espaciais na planta transformada. A possibilidade de regulação da expressão do transgene está, portanto, dependente do isolamento e caracterização de promotores das plantas (Videira, 2001).

Nas primeiras experiências de transformação de plantas, o promotor utilizado foi um promotor isolado de um vírus que infecta plantas o chamado promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S) (Viljoen *et al.*, 2005, Videira 2001).

Actualmente os elementos promotores e terminadores usados para transformar muitas das modificações genéticas em plantas são os *Cauliflower mosaic* vírus promotor (P-35S) e o *Agrobacterium tumefaciens nopaline synthase terminator* (T-Nos), embora outros promotores e terminadores poderem ser utilizados (Holst-Jensen, 2001).

Este promotor é um promotor “constitutivo forte”, o que significa que é expresso em todos os tecidos da planta ao longo de todas as fases do seu desenvolvimento (Videira, 2001).

Quase todas as plantas geneticamente modificadas contém pelo menos uma cópia do P-35S, T-35S e ou T-Nos, como uma parte do gene constituído e integrado no seu genoma. Consequentemente, métodos para detectar um destes elementos têm sido difundidos com propósitos de detecção (Holst-Jensen, 2001).

3.6. Electroforese

Algumas moléculas biológicas importantes como aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos possuem grupos ionizáveis e podem existir em soluções como espécies carregadas electricamente, tal como os catiões (+) ou aniões (-). Além disso, as moléculas que têm cargas semelhantes terão diferenças na razão carga/massa, quando elas têm diferenças inerentes ao peso molecular (Wilson e Goulding, 1986)

Em combinação, estas diferenças formam bases para uma migração diferencial quando os iões na solução são sujeitos a um campo eléctrico. Este é o princípio da electroforese (Wilson e Goulding, 1986) que é definida como a migração diferencial de compostos com cargas quando sujeitos a um campo eléctrico (Duclós, 2004).

Frequentemente, a electroforese é usada para verificar se as reacções de restrição e ligação foram feitas e para certificar se o ADN extraído está presente, ou para avaliar a pureza e o estado intacto da preparação do ADN (Garrett e Grisham, 1999).

3.6.1. Variações nos tipos de electroforese

A aplicação da separação dos fragmentos das biomoléculas é frequentemente levada a cabo em suportes sólidos como gel bond ou em géis, em vez de soluções livres, pelo facto dos géis suprirem as correntes de conversão produzidas por gradientes de temperatura, o que é necessário para uma eficiente separação, também pelo facto dos géis poderem servir de separadores moleculares que acentuam a separação (Montgomery, 1990).

3.6.2. Electroforese em géis

O uso de géis como meio de suporte tornaram largamente inúteis os sistemas electroforecticos previamente desenvolvidos; como a electroforese de baixa voltagem em camada fina e outras,

pelo facto de se poder separar substâncias de alto peso molecular semelhante a proteínas e ácidos nucleicos, por causa do melhoramento obtido na resolução (Voet e Voet, 1995).

As melhorias na resolução são devidas as propriedades físicas dos géis, que são insolúveis na água, hidrofílicos e coloides semi-sólidos, são também apontadas as propriedades moleculares e semi-rígidas dos géis como contribuintes na separação de largos compostos iónicos como as proteínas que têm cargas e propriedades similares, mas que diferem em tamanho e perfil (Wilson e Goulding, 1986).

3.6.3. Electroforese em gel de agarose

Agarose é uma componente não tóxica, definida quimicamente como mistura de um complexo em pó, contendo dois polímeros baseados em galactose, agarose e agarpectina (Wilson e Goulding, 1986).

A agarose é um polissacárido linear extraída de algas marinhas. As unidades de dissacáridos que compõe a agarose são a β -D-galactopiranosose e 3,6 anidro-L-galactose complexado com 1-3- β glycosídico. Este agarose encontra-se em seus variados graus de pureza, sendo recomendado a utilização de agarose ultrapura que esteja livre de ADNases (Righetti, 2005).

O gel de agarose tem tamanho de poros relativamente largos quando comparados com os de poliacrilamida (Andrews, 1986) e foi usado numa primeira fase para separar moléculas muito grandes. Os géis de agarose processam-se mais facilmente que os de poliacrilamida e o seu poder de resolução é comparativamente baixo. Normalmente a agarose é aplicada em concentrações que variam entre 1 e 3 % (Righetti, 2005).

A dissolução do agarose acontece em tampões aquosos (TAE ou TBE) em ebulição e, tendendo formar o gel a temperatura de 38°C, em temperatura ambiente ou mesmo em temperaturas mais baixas. Com 1% do gel em tampão e respectiva relação peso volume, agarose apresenta alto conteúdo de água, boa estrutura fibrosa (e boas propriedades anticonvecionais), com um largo tamanho dos poros e baixa resistência friccional. O movimento de iões torna-se muito rápido durante a electroforese, auxiliando desse modo a separação das macromoléculas. Géis de agarose

purificados têm existido e sido usados extensivamente para separação de ácidos nucleicos e fragmentos de ADN tratados com enzimas de restrição, por carecerem de peneiras moleculares e condições electro-osmoticas (Wilson e Goulding, 1986).

A velocidade de migração dos fragmentos de ADN no gel é determinada pela concentração de agarose, voltagem aplicada e o tipo de solução tampão. Sua visualização é proporcionada pela ligação dos fragmentos de ADN com brometo de etídio, composto que tem a capacidade de se inserir em fendas de ADN e apresentar fluorescência por acção da excitação ultravioleta (Alves *et al.*, 2003).

Para resolução das amostras no gel de agarose podem ser aplicados vários tipos de agarose, onde a sua resolução dependerá da concentração da agarose. Concentrações baixas são aplicadas para resolução de fragmentos de elevado peso molecular que podem variar de 100 – 70000 pb com intervalo de concentração de agarose que varia de 2% a 0,3%, como pode ver na tabela 2 do anexo I (www.google.br).

De acordo com a percentagem da agarose é possível separar fragmentos de ADN resultantes da PCR. Na electroforese de agarose vários tampões têm sido utilizados para dissolução da agarose assim como para a corrida electroforectica (Acetato, citrato, barbitone, fosfato etc.) (Wilson e Goulding, 1986). Porém, de entre eles os mais usados são TAE e TBE (Tris acetato EDTA ou Tris boreto EDTA), respectivamente (Vidigal *et al.*, 2000, www.google.br).

3.7. Electroforese em géis de Poliacrilamida

Existem dois tipos de materiais básicos para elaboração de géis com fins moleculares; a agarose e a poliacrilamida. A técnica electroforetica em gel de poliacrilamida foi introduzida por Raymond e Weintraub em 1959. É preparado com o uso de sintéticos químicos altamente tóxicos, é estável, de preparação difícil e manuseio em relação ao gel de agarose, mas com um potencial extremamente alto na separação de fragmentos de ADN, com apenas um pb de diferença (Sambrook *et al.*, 1989).

O suporte gelatinoso de poliacrilamida é preparado a partir de quatro soluções, (1) mistura de acrilamida e bis-acrilamida ou piperasina, normalmente, os dois químicos nas proporções

adequadas (prepara-se uma solução "Stock"); (2) tampão adequado; (3) um agente polimerizador (APS) e; (4) um catalizador da reacção de polimerização (TEMED). O processo é altamente reprodutível o que torna esta metodologia extremamente precisa (Garcia, 2000).

O gel de poliacrilamida forma uma malha constituída por um polímero formado a partir de acrilamida (monómero) e bis-acrilamida (*cross-linker*), ligados quimicamente (Garcia 2000, Garrett e Grisham 1999, Andrews 1989).

O monómero de acrilamida $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$ é copolimerizado com o agente de ligação cruzada, habitualmente *N, N'* - metilenobisacrilamida ($\text{CH}_2(\text{NHCOCH}=\text{CH}_2)_2$), com uma mistura contendo o agente catalítico acelerador e iniciador da cadeia de polimerização. A mistura consiste em amoníum-persulfato como agente catalítico e uma concentração adequada de uma base, como a dimetilaminopropionitrile (DMAP) ou *N, N, N', N'* -tetrametilenodiamina (TEMED) como iniciador. Frequentemente é usado o TEMED e aumentos proporcionais na sua concentração aumentam a velocidade de polimerização. Outro aspecto que se observa é a inibição da polimerização pelo oxigénio molecular sendo por isso, necessário desgaseificar a solução ou evitar introdução de oxigénio, evitando assim a inibição química da polimerização (Pazur 1995, Voet e Voet 1995, Andrews 1989).

Os poros de um gel são determinados pela proporção relativa de monómeros de acrilamida em relação ao agente de ligação cruzada. Estes géis são definidos pela percentagem total da acrilamida presente. Eles podem ser preparados contendo cerca de 3% a 30% de acrilamida, correspondendo a um tamanho de poros de 0,5 nm e 0,2 nm de diâmetro respectivamente (Wilson e Goulding, 1986).

Concentrações inferiores de acrilamida em seus géis apresentam tamanhos de poros largos, oferecendo desse modo menos resistência a passagem de moléculas largas. Em termos gerais, uns

30% de acrilamida é adequado para a separação de compostos contendo peso molecular em volta de 10^4 dalton, enquanto géis de 3% serão adequados para separar compostos tendo peso molecular em volta de 10^6 daltons (Wilson e Goulding, 1986).

Uma das importantes características do gel de poliacrilamida que aumenta a sua utilidade na separação de macromoléculas inclui a sua capacidade mínima de adsorção e ausência de fenómenos de electro – osmosis (Wilson e Goulding, 1986).

Na elaboração dos géis de poliacrilamida existe a prática de utilização de um suporte acrílico, o gel bonde, este apresenta duas faces diferentes, uma sendo hidrofílica ou tem afinidade com a água e a outra hidrófoba ou seja não tem afinidade com a água. A parte hidrófoba permite a fixação do gel, fácil manipulação e coloração do gel em prata, reagente de revelação, sem que este se quebre. Dois tipos de géis de poliacrilamida são conhecidos: o desnaturante e não desnaturante ou naturante. Os desnaturantes são aplicados para análise de ADN de cadeias simples, sendo polimerizados na presença de agentes desnaturantes como a formamida ou ureia. Os géis não desnaturantes permitem a análise de cadeia dupla. O tamanho e a concentração dos poros no gel de poliacrilamida serão determinados de acordo com as quantidades dos reagentes e podem ser definidas pelas equações:

$$T = \frac{(a+b) \times 100}{V} [\%]$$

$$C = \frac{bx100}{a+b} [\%]$$

Onde:

T: tamanho dos poros

C: concentração dos poros

a : quantidade de acrilamida em gramas

b : quantidade da metilbisacrilamida em gramas

v: volume em mililitros (Andrews 1986, Instruction Manual BIORAD).

3.8. Tampões aplicados na electroforese.

Normalmente os tampões são aplicados para controlar o pH do meio, e em duas fases do processo electroforetico em géis de agarose. Comummente as soluções usadas são as de TAE ou TBE, estes são aplicados para a dissolução do pó de agarose e na tina ou tanque de corrida electroforetica onde se encontram os eléctrodos, o cátodo e ânodo (Stryer, 1996).

Nos eléctrodos a corrente eléctrica é conduzida através dos electrões enquanto nas soluções tampão da tina e gel ela é conduzida pelos iões. Em presença de um sistema tampão adequado a hidrólise da água, que se dá na superfície de cada eléctrodo possibilita que haja trocas de movimentos entre os electrões e iões (Russell, 1994).

Os tampões que se usam normalmente mantêm o pH inalterado e garantem o campo eléctrico no decorrer da corrida electroforetica e são constituídos por EDTA com um valor de pH entre 7,5 a 8 (Dawkins, 1989).

3.9. Factores que influenciam a electroforese

Dos factores que influenciam a electroforese destacam-se: o campo eléctrico, a amostra, o tampão e o meio de suporte.

3.9.1. O campo eléctrico

Voltagem – os eléctrodos encontram-se separados por uma distância d dada em metros e, a diferença de potencial entre eles é expressa em V voltes, com gradiente potencial achado em V/d volts m^{-1} e a força do ião que transporta a carga q dada em coulomb é Vq/d newton. Esta força é a causa da migração que é proporcional a Vq/d . Assim a mobilidade dos iões causada por essa

força é proporcional ao aumento do gradiente potencial que afecta a migração das biomoléculas (Wilson e Goulding, 1986).

Corrente – esta é medida em Coulomb/s ou Amper e é gerada quando se aplica a diferença de potencial entre os eléctrodos. A força do meio determina o tamanho da corrente. Ela é conduzida pelos iões do tampão do meio e pelos iões da amostra, sendo assim a distancia de migração dos iões é condicionada pela corrente e pelo tempo (Wilson e Goulding 1986, Freifelder 1982).

Resistência – a resistência é medida em ohms e expressa a relação entre a intensidade e a voltagem. A corrente e a migração são inversamente proporcionais a resistência, que por seu lado é função do tampão e sua respectiva concentração. A resistência aumenta com o comprimento do meio de suporte e diminui com a área de secção transversal e com aumento da concentração iónica do tampão. Um aumento da temperatura faz com que a resistência diminua. Parte deste efeito é devido ao aumento da mobilidade dos iões como resultado da diminuição da resistência da viscosidade (Wilson e Goulding, 1986).

3.9.2. A amostra

A natureza das Biomoléculas afecta a migração de varias maneiras:

Carga – a velocidade de migração aumenta com aumento da carga. A magnitude da carga é geralmente pH dependente (Dawkins, 1989).

Tamanho – o movimento de migração diminui com o aumento do tamanho da molécula, devido ao aumento friccional das forças electrostaticas exercidas ao redor do meio (Andrews 1989, Dawkins 1989).

Conformação – moléculas com tamanhos similares, mas conformações diferentes exibem características migratórias diferentes causadas por efeitos diferenciados de forças de fricção e electrostáticas (Dawkins, 1989).

3.9.3. O tampão

Este determina e estabiliza o pH do meio de suporte e afecta a velocidade de migração dos compostos de varias formas.

Composição—os tampões de uso comum são formados por Tris, EDTA, e Acetato ou Boreto, quando este se liga aos compostos por separar altera a velocidade de migração, por vezes este actua como solvente e este efeito é observado em moléculas pequenas como aminoácidos. A extensão da difusão do tampão poderá ser minimizada evitando sobrecarga da amostra ou aplicando as amostras como bandas largas, até mesmo usando alta voltagem em tempos curtos e se possível removendo o meio de suporte rapidamente depois que terminar a corrida electroforética (Wilson e Goulding, 1986).

Concentração—a resistência iónica do tampão aumenta a proporção da corrente transportada pelo tampão, o que condiciona a diminuição da corrente transportada pela amostra. Esta resistência iónica aumenta a corrente assim como o aquecimento. Baixa resistência iónica do tampão irá diminuir a proporção da corrente transportada pelo tampão e aumentará a corrente transportada pela amostra, este aumento reflecte-se na velocidade da migração (Walkman e Goleiem, 1986).

pH – este tem pouco efeito em compostos altamente ionizados como os sais inorgânicos, mas para compostos orgânicos este determina a extensão da ionização. A ionização dos ácidos orgânicos aumenta com aumento do pH. Assim, a migração é também dependente do pH (Dawkins 1989, Aleyassine 1984).

3.9.4. O meio de suporte

O meio de suporte é reactivamente inerte, a sua exigente composição evita a existência da adsorção e electro-osmose. Cada um destes componentes afecta a migração dos compostos.

Adsorção – é a retenção das moléculas da amostra pelo meio de suporte. Quando a adsorção é observada ela causa resíduos na amostra, afectando a resolução das amostras (Wilson e Goulding, 1986).

Electro-osmose – este fenómeno resulta da natureza relativa da carga produzida entre moléculas de água no tampão, a superfície e o meio de suporte. A electro-osmose acelera o movimento de catiões, mas retarda a transferência de aniões (Walkman e Goulding, 1986).

3.9.5. Função de alguns reagentes usados no processo de extracção do ADN

Dodecil sulfato de sódio (**SDS**) - é um detergente aniónico que se liga fortemente as proteínas, causando sua desnaturação (Wilson e Goulding, 1986).

Etanol e isopropanol (-20) – estes têm a função de precipitar o ADN (Silva *et al.*, 2006, Lin e Hwang 2006)

Fenol: fenol clorofórmio: álcool isoamilico (25:24:1) - estes facilitam a extracção do supernatante, diferenciando a amostra em supernatante e sobrenadante e precipitam o ADN (Lin e Hwang 2006, Santos *et al.*, 2006).

Clorofórmio – este tem a função de desproteinizar a amostra (Silva *et al.*, 2006).

4. Objectivos

4.1. Geral

- Aprofundar conhecimentos sobre técnicas de biologia molecular, através de treinamento em técnicas moleculares em uso no Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane

4.2. Específicos

- Reciclar géis de agarose e respectivo tampão (TAE) que é aplicado na corrida electroforetica;
- Aprender a aplicar os marcadores ITS e RFLPs, usados para distinguir geneticamente ecotipos de feijão nhemba (*Vigna unguiculata*) de Moçambique;
- Aprender técnicas sobre marcadores moleculares STR aplicadas no estudo de frequências alélicas da população moçambicana
- Estabelecer protocolos e técnicas de detecção de modificação genética em plantas, supondo existência do promotor CaMV 35S (fase preliminar)

5. Material e Métodos Utilizados no Estágio

5.1. Materiais

Durante o período do estágio foram ensaiados cinco métodos de extracção de ADN; anexo II. O processo de recolha das amostras e as origens vêm explicados e apresentados no anexo III. Os materiais usados são apresentados no anexo IV.

5.2. Metodologia

5.2.1. Quantificação do ADN extraído pelo método II.I do anexo II.

Para a quantificação do ADN foi usado o espectrofotômetro SmartSpec™ 3000 da BioRaD (figura 1).



Figura 1. Espectrofotômetro usado na quantificação das amostras extraídas com o método II.I do anexo II.

Este instrumento permitiu avaliar com rigor a concentração do ADN expressa em $\mu\text{l/ml}$ que equivale a $\text{ng}/\mu\text{l}$ e medir a absorvância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm respectivamente.

A cuveta utilizada foi de 1cm de lado com capacidade total de 100 μl .

Antes da quantificação real foi feito o *read blank* com água *Milliq* (utilizada na diluição do ADN), de modo a padronizar as leituras, as quais resultaram em valores de concentração 0.0 e de absorvâncias mensurados a 260 e 280 nm também de 0.0.

Critério de validação:

Na quantificação do ADN, foi feita diluição de 5 μl do ADN contra 95 μl de água, com factor de diluição 20. A validação das amostras por aplicar no estudo foi feita com base na razão dos valores obtidos através das absorvâncias lidas a 260 e 280 nm. Onde a razão das absorvâncias A_{260} / A_{280} indicava a pureza do ADN, quando o resultado achado encontrava-se entre 1.8 e 2.0. Se o valor achado estivesse abaixo de 1.8 indicava contaminação por ARN e acima de 2.0 contaminação por proteínas; suscitando que se descartasse a amostra ou fosse feita mais uma lavagem da amostra a partir do passo fenol: clorofórmio: álcool-isoamílico do método II.I do anexo II.

5.3. Reciclagem do gel de agarose e tampão TAE 1X

Na reciclagem do gel de agarose foi preparada a solução TAE 1X a partir da solução Stock de TAE concentrada 50X (vide a composição no anexo VI). Esta preparação foi feita diluindo esta solução Stock, com ajuda da equação $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, onde para preparar 1000 ml de TAE 1X fez-se:

$50X \cdot V_1 = 1X \cdot 1000$; $V_1 = 20$ ml TAE 1X e acrescentou-se água aos 20 ml até fazer o volume final de 1000 ml. Esta solução foi usada na tina de corrida electroforetica num volume de 710 ml e para a dissolução do pó agarose num volume de 40 ml.

Na preparação do gel usou-se 2% de agarose que se converteu em 0,8 g e dissolveu-se em 40 ml de TAE 1X.

Uma vez feita a conversão de 2 % de agarose para 0.8 g pesou-se as 0.8 g na balança analítica, mediu-se os 40 ml de TAE 1X numa proveta graduada, e transferiu-se para um Erlenmeyer os dois componentes (fig. 2, A-B e C).

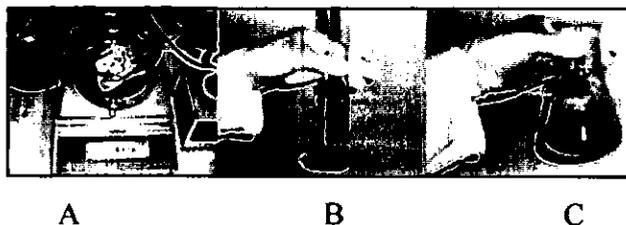


Figura 2. Em A) balança, B) solução TAE 1X, 40 ml e C) mistura dos dois componentes em A e B.

Dissolveu-se a solução de agarose no microondas até clarear, tendo o cuidado de evitar que a solução ferve-se, fez-se a dissolução em 2.5 minutos. Enquanto isto acontecia efectuou-se a montagem da plataforma (Cuba) do gel com uma fita adesiva e o respectivo pente, (fig. 3, A e B).



Figura 3. Em A) a plataforma ou cuba e seu pente, B) microonda para dissolver o agarose.

Retirou-se do microondas e deixou-se arrefecer até a temperatura de $\pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e adicionou-se Brometo de etídio (EtBr) dois microlitros ($2\text{ }\mu\text{l}$) na proporção de $0,5\text{ }\mu\text{l}$ em cada 10 ml de solução TAE 1X e agitou-se.

Verteu-se a solução na plataforma e deixou-se polimerizar a temperatura da sala electroforectica. Uma vez o gel polimerizado, retirou-se a fita adesiva da cuba (plataforma) e transferiu-se para a tina (tanque) de corrida electroforectica, onde se retirou o pente e fez-se o carregamento das amostras com $10\text{ }\mu\text{l}$ de ADN para $2\text{ }\mu\text{l}$ do tampão de carregamento (*loading buffer*), (fig. 5).



Figura 5. Tampão de carregamento das amostras para a corrida electroforectica.

Ligou-se a tina na fonte de corrente tendo em conta a polaridade e sentido da corrida electroforectica. Aplicou-se a voltagem, intensidade adequada (100V ; 2A) e tempo de corrida (60 min), e pôs-se o gel a correr (fig.6).



Figura 6. Equipamento electroforectico, a esquerda a tina e a direita a fonte de corrente.

5.4. Amplificação do ADN por PCR para estudo dos STR simplex

Na amplificação do ADN humano para estudo dos STR simplex foram usados Kits da GenePrint[®] STR System, foram amplificados cinco locus CSF1PO; F13A01; F13B; LPL; HPRTB e o primeiro locus amplificado foi o CSF1PO localizado no 5q (33,3-34). O mix dos reagentes de amplificação foi feito na capa de fluxo laminar (fig.7) e de acordo com a tabela 3 do anexo I.



Figura 7. Capa de fluxo laminar para preparação do mix para PCR

Para o processo desinfetou-se com álcool o fluxo laminar e ligou-se a luz UV durante 30 minutos antes de se iniciar o mix. Marcaram-se os tubos ependorf para PCR e fez-se o mix. Distribuiu-se o mix em 16 tubos, dois deles para o controlo positivo e negativo. O controlo positivo foi o K 562 ADN enquanto o negativo foi a água *Milliq*, ambos são adicionados aos 22.5 µl do mix assim como para cada amostra de ADN. Preparou-se os reagentes em gelo e no processo do mix manteve-se o vácuo da capa ligado. Enquanto o mix era feito ligou-se o Termocyclador Icyler para a reacção de amplificação fig 8.



Figura 8. Termocyclador (BIO-RAD) a esquerda usado para amplificação.

Terminada a adição das amostras ao mix e tendo-se um volume de reacção igual a 25 µl foi feita a amplificação de acordo com o protocolo da tabela 4 do anexo I.

5.5. Preparação do gel de Poliacrilamida

Normalmente para a preparação do gel de poliacrilamida tem-se usado a Bisacrilamida. Neste estágio foi usada a Piperasina e a Bisacrilamida, em situações diferentes.

Na preparação da poliacrilamida usou-se: Solução "Stock" constituída por acrilamida, piperasina e Tris-Hcl; o glicerol; APS a 10% e TEMED. A tabela 5 do anexo I ilustra as quantidades dos constituintes da solução "Stock" e do gel.

Os poros tinham tamanho T_9 e Concentração C_5 , estes foram determinados com base nas

equações $\bar{T} = \frac{(a+b) \times 100}{V} [\%]$ onde $\bar{T} = (8.55+0.45) \times 100/100$; $\bar{T}=9$ e $C = \frac{b \times 100}{a+b} [\%]$ onde $C =$

$0.45 \times 100 / (8.55+0.45)$; $C = 5$.

Para a obtenção da matriz do gel foram usadas duas cassetes de vidro com 15 cm de comprimento e 13 cm de largura. Antes da montagem as cassetes foram lavadas com água corrente e detergente, depois lavou-se com água destilada e foi passado álcool a 70% e deixou-se secar.

Uma vez as cassetes secas levou-se uma das componentes que não apresentava poços. Sobre esta cassette foi depositada a superfície hidrofílica do gel bond (suporte de filme transparente, feito de poliéster com 0.18 mm de espessura) entre a cassette e a parte hidrofílica colocou-se um pouco de água e passou-se um rolo para criar maior adesão entre o gel bond e o vidro. Depois colocou-se a cassette com poços sobre a parte hidrófoba do gel e foram encaixadas com molas de pressão. Terminada a armação foi posta a solução de poliacrilamida entre as cassetes e a parte hidrófoba do gel bond, de acordo com a tabela 5 do anexo I.

Para polimerizar o gel levou uma hora de tempo e durante a polimerização a piperasina forma linhas verticais enquanto a acrilamida forma linhas horizontais, formando linhas cruzadas que fazem os poros determinados pelo tamanho e concentração.

5.5.1. Corrida electroforetica do produto de Amplificação dos STRs em gel de poliacrilamida

Para a corrida electroforetica dos STRs desnaturou-se o produto amplificado com o STR 2x Load solution (Formamida), tendo sido aplicado 1 µl de formamida contra 2 µl do produto amplificado e submetido no Minicycler a 95 °C e 5', passados os 5' retirou-se rapidamente para o gelo e levou-se ao carregamento no suporte horizontal onde no pólo positivo foi posta a solução de eléctrodo embebida em cinco tiras de papel whatman (12 x 1.5 cm) (Anexo VI) tingida com azul de bromofenol e no pólo negativo a solução do eléctrodo embebida em cinco tiras de papel whatman não tingida com azul de bromofenol. Para cada poço carregou-se 3 µl das amostras, 3 µl do marcador de ADN e 3 µl de Ladder solution STR 2x. Terminado pôs-se a correr por 2 horas e 10 minutos com 150 Voltes, 25 mili amperes e 250 Watts (fig 9).

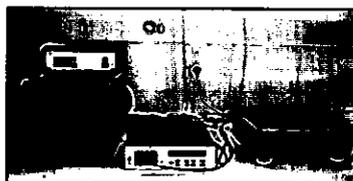


Figura 9. a esquerda refrigerador, no meio power pack Eps 3501 XL e a direita o suporte horizontal para corrida do gel de poliacrilamida.

5.5.2. Revelação do gel de poliacrilamida

Depois da corrida o gel foi revelado de maneira a se visualizarem os alelos dos locus STR, para isso submeteu-se o gel em 200 ml de álcool a 10% por 10 minutos com agitação lenta para fixar o ADN.

Decorridos os 10 minutos despejou-se o álcool e transferiu-se para Ácido nítrico a 1% e 200 ml durante 5 minutos, depois lavou-se o gel com água e transferiu-se para uma solução de nitrato de prata 0.28 M (para corar as bandas de ADN). O recipiente de revelação foi coberto com papel de alumínio evitando-se a desnaturação da prata pela luz. O processo durou 20 minutos com agitação lenta. Terminada esta fase lavou-se o gel duas vezes com água destilada.

Na revelação preparou-se a solução de carbonato de sódio num volume de 250 ml e adicionou-se 150 µl de formaldeído a 40%. Verteu-se aproximadamente a metade e agitou-se manualmente por algum tempo até que as bandas surgissem. Depois da agitação descartou-se a solução e voltou-se a acrescentar a outra metade de carbonato de sódio com adição de mais 150 µl de formaldeído a 40%. Logo que surgissem todas as bandas e antes que o gel escurecesse interrompia-se a reacção pela adição do ácido acético a 5%.

5.6. ITS na distinção dos ecotipos de *Vigna unguiculata*

O ADN para o estudo do ITS foi extraído pelo método II.3. (i) do anexo II. Após a extracção, o ADN foi amplificado (protocolo da tabela 10 anexo I), usando *primers* para ITS 1 com a seguinte sequência: Forward (5'AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG3') e Reverse (5'CTTTTCCTCCGCTTATTGATATG3'). O volume para a reacção da PCR foi de 25 µl obtido de acordo com a tabela 6 do anexo I.

Após a amplificação do ADN total, foram feitos vários cortes com as seguintes enzimas de restrição: *HindIII*, *BamHI* e *EcoRI*, como forma de RFLP. As restrições foram feitas de acordo com as tabelas 7, 8 e 9 do anexo I.

Depois das restrições foi feita a electroforese em gel de agarose e poliacrilamida. Usou-se 2% de agarose e 30 ml de TAE 1X durante 45 minutos e 100 Voltes, num dos poços foi carregado o marcador de peso molecular. Para o gel de poliacrilamida foi usado 10 ml de solução *Stock* 56.92

μ l de APS, 11.54 μ l de TEMED e 795.38 μ l de glicerol e; correu-se a 150 Voltes, 25 mili amperes, 25 wattes durante uma hora de tempo. As bandas foram observadas por UV e registradas no gel *document system* no caso da electroforese em gel de agarose.

5.7. Detecção de Modificação Genética de Plantas.

Na detecção de modificações genéticas, o ADN foi extraído pelos métodos II.3 (ii) e II.4 do anexo II. O ADN extraído pelos métodos referidos foi amplificado com base nas quantidades reaccionais da tabela 13 do anexo I, para detectar a região promotora CaMV 35S, sequência transgénica provável de ter sido inserida. Depois da extracção do ADN foi feita a amplificação por PCR, com *primers* para o promotor CaMV 35S e os ciclos de amplificação encontram-se na tabela 14 do anexo I. O produto amplificado foi analisado em géis de poliacrilamida e agarose.

6. Resultados

6.1. Quantificação

Os dados ilustrados na tabela 12 do anexo I foram obtidos através da quantificação de ADN extraído com o método II.I do anexo II. As amostras com o sinal (*) foram descartadas.

6.2. Reciclagem de géis de agarose

Na primeira corrida electroforectica do ADN total foram observadas bandas de acordo com a figura 1 do anexo V. Todas as amostras estão presentes, mas as amostras 2, 3, 4, 5, 11, 15, 17 e 19 estão pouco visíveis.

Na primeira reciclagem são observadas três bandas do grupo 15, duas bandas do grupo J, uma banda do grupo E, uma banda do grupo 2, figura 2 do anexo V.

Na segunda reciclagem pode-se observar bandas em amostras E, J, 2, X, 15, 54 e 55 figura 3 do anexo V.

Na terceira reciclagem vêem-se três bandas do grupo 5, uma banda do grupo J, uma banda do grupo 2 e nenhuma banda do grupo E, figura 4 do anexo V.

6.3. STR

Aqui são apresentados resultados preliminares do estudo dos STR. Depois desta fase far-se-á o alinhamento dos alelos com base no *ladder* alelico. Os dados serão codificados e enviados para a leitura dos alelos num programa específico o *Genotype*. As figuras 6, 7 e 8 do anexo V apresentam os alelos dos locus CSF1PO, HPRTB e F13B estudados por STR simplex.

6.4. ITS 1 na distinção de ecotipos de *Vigna unguiculata*.

A aplicação do RFLP, depois da amplificação do ADN da *Vigna unguiculata* pelo marcador ITS1, produziu igual número de bandas para os ecotipos 14C, 14D, 14G digeridas com *Hind* e *BamHI* e diferentes para os ecotipos 14F e 14I digeridas por *Hind* e *BamHI*. Todas as amostras apresentaram o mesmo número de bandas depois de digeridas pela *EcoRI*. As bandas foram distinguidas através do seu peso molecular evidenciado pelo marcador de peso molecular. Veja a tabela 11 no anexo I e a figura 5 do anexo V que mostra as bandas dos ITS em gel de agarose, amplificado mas não digerido.

6.5. Detecção de OGMs (Plantas)

Com base na metodologia usada, as amostras Milho para Zimbabwe e Ervilha amarela processada, foram positivas; vide anexo III e tabela III.3.

7. Discussão

7.1. Quantificação

As amostras 9, 17, 21, 22, 24, 25 e 26 da tabela 12 do anexo I foram descartadas pelo facto do cociente achado entre as absorvâncias encontrar-se fora do intervalo 1.8 a 2.0.

Todos os valores da razão estão acima de 2.0, significando valor de absorvância a 260 nm maior que o da absorvância a 280 nm, que segundo Sánchez e Jouve, 1999 significa contaminação da amostra por proteínas.

7.2. Reciclagem do agarose e do tampão TAE 1X

A palidez observada nas bandas das figura 1, 2, 3 e 4 do anexo V podem ser derivadas de pouca quantidade de ADN, resultantes de prováveis falhas no processo de extracção do ADN, pois uma boa extracção condiciona maior qualidade na nitidez das bandas. O tempo que se levou para analisar as bandas e as condições de transporte sob efeito dos raios solares pode estar na origem das diferenças de visibilidade das bandas, uma vez que o gel era feito no CBUEM e analisado na Faculdade de agronomia.

Na quarta reciclagem o volume da solução do gel de agarose diminuiu consideravelmente e o gel tornou-se muito fino, não sendo possível observarem-se bandas, pois durante o carregamento das amostras a maior parte desta perdia-se no tampão de corrida.

Durante a corrida, o tampão TAE 1X aquece e evapora. O vapor observou-se na fase superior da tina por criação de uma massa de bolhas, o que poderá estar na razão da diminuição do volume da solução durante o processo de reciclagem.

7.3. Marcadores ITS, usado na distinção de ecotipos de *Vigna unguiculata*

As amostras analisadas através das enzimas de restrição (RFLP) mostraram ter um grau de polimorfismo diversificado.

Os ecotipos 14C, 14D e 14G da tabela 11 (anexo I) apresentaram similar grau de polimorfismo, com apenas uma banda produzida pelas enzimas *HindIII*, *BamHI* e *EcoRI*. De acordo com Souframanien *et al.*, 2003 estudo semelhante usando 12 enzimas de restrição permitiu distinguir diferenças interespecificas entre cultivares de *Vigna trilobita*, *V. glabrescens* e *V. mungo* usando ITS1 e ITS2 e não foram obtidas diferenças intraespecificas.

Segundo Saini *et al.*, 1999 a não restrição pela *BamHI* é devida a metilação, uma vez que amostras não digeridas pela *BamHI* sensível a metilação quando digeridas pela *BstYI* insensível a metilação apresentam locais de restrição.

O ecotipo 14F apresentou 3 bandas quando digerido pela *HindIII* e *BamHI*, outrora este mesmo ecotipo quando digerido pela *EcoRI* apenas apresentou uma banda. Já o ecotipo 14 I apresentou 1 banda quando digerido pela *EcoRI* e 2 por *HindIII*.

7.4. Detecção de OGM (Plantas)

Segundo Holst-Jensen 2001, o método de detecção usado encera um problema, o de dar um falso positivo uma vez que a região detectada também ocorre naturalmente em vírus, podendo encontrar-se no local onde as plantas são cultivadas

A detecção pelo promotor CaMV 35S em plantas como membros da *Brassica*, um resultado positivo resultante da análise do promotor poderá ser um falso positivo, uma vez que o vírus do mosaico *cauliflower* ataca esta planta naturalmente. Com isso, outras análises são necessárias para complementar o estudo de detecção estabelecido (Lübeck, 2006).

8. Conclusão

Com base nos objectivos do trabalho, a conclusão geral é de que o estudo das técnicas de biologia molecular é importante para diagnósticos clínicos, estudos de populações de microorganismos, plantas, humanas, etc. Podendo também ser aplicadas para detecção de alterações em genomas de qualquer que seja o organismo. Em termos mais específicos o estágio chegou as seguintes conclusões:

- Foi possível reciclar o tampão TAE 1X 6 vezes, visto que depois da sexta reciclagem se notou diminuição do volume;
- Foi possível reciclar o gel de agarose 3 vezes;

- ¹As amostras que apresentaram apenas uma banda significa que não foram digeridas pelas enzimas;
- Os ecotipos 14C, 14D e 14G são geneticamente próximos;
- Os ecotipos 14F e 14I podem ser distantes entre si e em relação aos outros;
- Foi estabelecida (fase preliminar) a metodologia de detecção de OGMs (Plantas), baseada no promotor CaMV 35S.
- O estágio facilitou maior proximidade do estudante estagiário ao conhecimento prático das técnicas aprendidas durante a formação que é mais valia para a carreira e, ofereceu oportunidade para desenvolver reflexões sobre diferentes instituições que trabalham na área de investigação ao nível da própria universidade, assim como em locais como o Centro de Investigação da Manhiça, Departamento de Microbiologia e Imunologia ao nível do Ministério da Saúde, como sendo potenciais focos de emprego onde poderá aplicar os conhecimentos colhidos no estágio.

9. Recomendações

- Recomenda-se a reciclagem de géis de agarose, dada a sua importância económica, porque cada reciclagem permite economizar em média 1,53 dólares.
- Recomenda-se que se façam mais estudos de ITS, com uso de um leque mais amplo de enzimas de restrição ex. (*Bst*YI, *Taq*I, *Sau*3AI, *Sac*I, *Msp*I, *Hae*III *Alu*I) e que sejam analisadas ambas regiões ITS1 e ITS2 das espécies que forem estudadas, de modo a permitir maior esclarecimento e melhores conclusões em futuros estudos.
- Recomenda-se que nos próximos testes de presença de modificação genética em plantas sejam usados controlos positivos e negativo.

¹ Resultados não definitivos.

- Recomenda-se que o CBUEM, tenha uma lista de possíveis riscos, que os utentes do centro podem correr, e os cuidados a ter ao manusear os reagentes e equipamentos.

10. Bibliografia

Ajay, S., T. G. Krishna, K. S. Reddy & N. Jawali (2000). The *Bam*HI site in the Internal Transcribed Spacer Region of Mungbean Ribossomal RNA Gene is Partially Methylated. *Euphytica*, 114: 55-59.

Aleyassine, H. (1984). Determination of Glycosylated Hemoglobin by Affinity Electrophoresis on Agarose gel. *Clinical Chimica Ada*, 142: 123-130.

Alonso Alonso, A. (1999). Regiones Microsatélite del Genoma Humano (Short tandem repeats). Aplicaciones en Genética Forense. In: Jarreta, B. M. (edition). La Prueba del AND en Medicina Forense. La Genética al Servicio de la Ley en el Análisis de Indicios Criminales y en la Investigación Bbiológica de la Paternidad, 72-83 pp. Barcelona, Masson, S. A.

Alves, A., I. Henriques, A. Santos, M. Tação & A. Correia (2003). Tipagem Genética de Microrganismos, Tese de Mestrado. 24 pp. Aveiro, Universidade de Aveiro.

Andrews, A. T. (1986). Electrophoresis. Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications, segunda edição, 452 pp. Oxford University Press.

Barcaccia, G., M. Lucchin & P. Parrini (2000). Analise del Genoma Mediante Marcatori Moleculari: I. Fondamenti Metodoloici, 5: 5-15.

Belgrader, P., F. Raisi, R. Joshi, P. Nguyen, W. McMillan, J. Ching, R. Chang & M. A. Northrup (2001). Rapid and Automated Cartridge-Based Extraction of Leukocytes from Whole Blood for Microsatellite DNA Analysis by Capillary Electrophoresis. *Clinical Chemistry*, 47: 1929-1931.

Bonaccorso, N. (2005). Análise Forense de DNA, WWW.Google.com, www.peritocriminal.com.br/dna.htm, 03. 02. 2005, 15. 04. 2005.

Boyer, S. L., V. R. Flechtner & J. R. Johansen (2001). ISthe 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Rigion a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics ? A Case Study in Cyanobacteria. *Society for Molecular Biology and Evolution*, 18 (6): 1057-1069.

Branden, C. & J. Tooze (1991). Introduction to Protein Structure, 802 pp, New York, Garland Publishing, Inc.

Brown, T. A. (1989). Genetics, a Molecular Approach, Terceira edição, 469 pp. United Kingdom, Stanley Thornes (Publishers) Ltda.

Campos, L. S. (1999). Entender a Bioquímica, O Metabolismo Fundamental em Animais e Plantas. Segunda edição. 683 pp. Lisboa, Escolar editora.

Darbre, P. D. (1999). Basic Molecular Biology Essential Techniques. 194 pp, England, Series Editor.

Darnell, J., H. Lodish, & D. Baltimore (1983). Biología Celular y Molecular, Segunda edição. 1188 pp. Barcelona, Ediciones Omega S.A.

Dawkins H. J. S. (1989). Large DNA Separation Using Field Alternation Agar Gel Electrophoresis. Journal of Chromatography. 492: 615-639.

Della Porta S. L., J. Wood & J.B. Hicks (1983). A plant DNA Minipreparation: Version II. Plant Mol. Rep., 1:19-21.

Delvin, T. M. (2002). Biochemistry With Clinical Correlations, Quinta edição. 1216 pp. New York, Wiley-Liss.

Duclós, C. C. A. (2004). Electroforese de Macromoléculas. www. Google.com, <http://osulibrary.Orst.edu/specialcollections/coll/pauling/dna/videos/dnastory01>. 30.10.2004/18.03.2006

Edwards, A. I., A. Civitello, H. A. Hammond & C. T. Caskey (1991). ADN Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats. Am J Hum Genet, 49: 746-756.

Erlich, H. A. (1989). PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, 246 pp. United States, M Stockton Press.

Freifelder, D. (1982). Physical Biochemistry and Molecular Biology, segunda edição. 294 pp.

Garcia, I. M. (2000). Electroforese em gel de Poliacrilamida: fundamentos, Actualidade e Importância. Univ. Diag 1 (2): 31-41.

García, S. (2002). Los organismos Genéticamente Modificados y el Análisis de Riesgo. NAPPO PRA Symposium, 1-5

Gardner, E. J., & D. P. Snustad (1987). Genética, Setima edição. 497 pp. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A.

Garrett, R. H., C. M. Grisham (1999). Biochemistry, segunda edição. 1127 pp. Florida, Saunders College Publishing.

Griffiths, A. J. F., J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin & W. M. Gelbart (1998). Introdução à Genética, Sexta edição. 856 pp. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A.

Griffiths, A. J. F., W. M. Gelbart, J. H. Miller, & R. C. Lewontin (1999). Modern Genetic Analysis, 675 pp. New York, W. H. Freeman and Company.

Herklotz, C. A. C. (2003). Aula Prática Sobre Enzimas de Restrição. WWW. Sinapsebiotecnologia.com.br. Sinapse@Sinapsebiotecnologia.com.br. 28.10.2003/ 14.02.2006.

Horton, H. R., L. A. Moran, R. S. Ochs, J. D. Rawn, & K. G. Scrimgeour (1996). Principles of Biochemistry, Segunda edição. 801 pp. United States of America, Prentice-Hall, Inc.

Horton, H. R., L. A. Moran, R. S. Ochs, J. D. Rawn & K. G. Scrimgeour (2002). Principles of Biochemistry, Terceira edição. 862 pp. United States of America, Prentice-Hall, Inc.

Instruction Manual. (2000). Spectrofotometro, SmartSpec 3000. Catalog number 170-2501. BIO-RAD. Páginas 11-52.

Jarreta, B. M. (1999). La Prueba del AND en Medicina Forense. La Genética al Servicio de la Ley en el Análisis de Indicios Criminales y en la Investigación biológica de la Paternidad, 342 pp. Barcelona, Masson, S. A.

Jeffreys, A. J., V. Wilson & S. L. Thein (1985). Hypervariable "Minisatellite" Regions in Human AND. Nature, 314: 67-73.

John, S. W. M., G. R. Weitzner, R. Rozen & C. R. Scriver (1991). A Rapid Procedure for Extracting Genomic DNA from Leukocytes. Nucleic Acides Research, 71:137-152.

Konstantinov, K., S. M. Drinic, M. Sijacic, V. Iajev & M. Mataruga (2005). Molecular Markers Application for Genetic Resources Characterization of Different Plant Species. The Role of Biotechnology, 179-180.

Lacadena J. R. (2001). Genética Forense: Aspectos Científicos, Éticos y Legales. <http://www.Pntic.mec.es/tematicas/enetica>.

Latchman, D. (1997). Basic Molecular and Cell Biology. Third Edition. 299 pp, Great Britian, BMJ Publishing Group.

Lima, N., M. Mota (2003). Biotecnologia, Fundamentos e Aplicações, 504 pp. Lisboa, Edições Técnicas, Lda.

Lin, Wen-Feng e Deng-Fwu, Hwang (2006). Application of PCR-RFLP Analysis on Species Identification of Canned tuna, Food Control, Article in Press.

Lübeck, M. (2006). Detection of Genetically Modified plants-methods to Sample and analyse GMO Content in Plants and Plant products, Skov-og Naturstyrelsen, 1-24.

McKee, T. & J. R. McKee (1999). Biochemistry, An Introduction, Segunda edição. 619 pp. United States of America, WCB/Mc Graw-Hill.

Mini-Protea 3 Cell, Instruction Manual, Catalog Numbers 165-3301, 165-3302. (BIORAD).

Montgomery, R., T. W. Conway & A. A. Spector (1990). A Case Oriented Approach, sexta edição. 628 pp. CV Mosby Company.

Osório, M. R. B. & W. M. Robinson (2001). Genética Humana, segunda edição. 458 pp. São Paulo. ARTEMED Editora LTDA.

Pazur, J. H. (1995). Coupled Gel electrophoresis-agar Diffusion Method for the Detection of Tumor Antigens, Journal of Chromatography B, 663: 51-57.

Pinheiro, M. F. (2004). Noções Gerais Sobre Outras Ciências Forenses. 54 pp

Poltl R., C. Luckenbach, J. Hixson, & H. Ritter (1998). The Short Tandem Repeat Loci hTPO, THO1 and FGA. Human Heredity, 48: 318- 324.

Raven, P. H., R. F. Evert, & S. E. Eichhorn (1996). Biologia Vegetal, Quinta edição. 728 pp. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A.

Righetti, P. G. (2005). Electrophoresis: The March of Pennies, the March of dimes, Journal of Chromatography A, 1079: 24-40.

Russell, J. B. (1994). Química geral, segunda edição, volume 1, 621 pp. São paulo, Makron Books Ltda.

Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989). Molecular Cloning. A laboratory Manual. Segunda edição, 615 pp. New York.

Sánchez-Monge, E. & N. Jouve (1989). Genética, Segunda edição, 521 pp. Barcelona, Edição Ómega, S. A.

Santos, R. A., F de J. Holanda, M.M. da F. Moura (2006). Análise de Polimorfismos através de STRs em uma População de Porto Velho-Ro, 1-5.

Silva, L. M. C., R. R. C. Miranda & H. A. Santos (2006). Differential Diagnosis of Dog Hookworms Based on PCR-RFLP from the ITS Region of Their rDNA. *Veterinary Parasitology*, 140: 373-377.

Sánchez-Diz, P., T. De La Fé, B. Quintáns, A. Salas, M. Lareu, & A. Carracedo (2003). Y-Chromosome STRs in Populations of Bantu Origein from Mozambique: male Contribution to the Africa Genetic pool and Forensic implications. Elsevier Science B. V. All rights reserved, 1239: 419-424.

Singer, M., & P. Berg (1993). Genes Y Genomas Una Perspectiva Cambiante. 974 pp. Barcelona, Ediciones Omega, S.A.

Souframanien, J., A. Joshi, T. Gopalakrishna (2003). Intraspecific Variation in the Internal Transcribed Spacer Region of rDNA in Black Gran (*Vigna mungo* (L.) Hepper). *Current Science*, vol 85, 6:798-802

Stryer, L. (1996). Bioquímica. Quarta edição, 1000pp. Guanabara Koogan S. A.

Tamarin, R. H. (1996). Principios de Genética. 607 pp, Barcelona, Editorial Reverté,

Thompson, M. W., R. R. McLnnes, & H. F. Willard (1993). Genétima Médica, Quinta edição. 339 pp. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A.

Tozzini, A. C., M. C. Martinez, M. F. Lucca, C. V. Rovere, A. J. Distéfana, M. Del Vas & H. E. Hopp (2000). Semi- Quantitative Detection of Genetically Modified Grains Based on CaMV 35S Promoter Amplification. *Molecular Biology and Genetics*, 3 (2): 1-7

Valverde, E., C. Cabrero, R. Cao, M. Rodriguez-Calvo, A. Diez, F. Barros, J. Alemany & A. Carracedo (1993). Population Genetics of Three VNTR Polymorphisms in two Different Spanish Populations. *Int. J. Legal Med.* 105: 251-256

Vieira, A. (2001). Engenharia Genética, Principios e Aplicações, 168 pp. Lisboa, Edições Técnica, Lda

Vidigal, A. P., M. C. Paes, M. T. Silva (2000). Electroforese em Macromoleculas, WWW.Google.Pt.<http://www.dbio.uevora.pt/LBM/Foco/Electroforese/electrofores.html>, Junho de 2000, 14.10.2006.

Viljoen, C. D., B. K. Dape & G. M. Botha (2005). Detection of GMO in Food Products in South Africa: Implications of GMO Labelling, *African Journal of Biotchnology*, 5 (2): 73-82.

Voet, D. & J. Voet (1995). Biochemistry. Segunda edição. 1360 pp. New York, John Wiley & Sons, INC.

Weaver, R. F. & P. W. Hedrick (1997). Genetics, Terceira edição. 638 pp. United States of America, W. H. Freeman and Company.

Wilson, K. & K. H. Goulding (1993). A Biologist's Guide to Principles and Techniques of Pratical Biochemistry. Third Edition, 396 pp. Cambridge, Cambridge University Press.

Wom, H., S. S. Renner (2005). The Internal Trancribed Spacer of Nuclear Ribosomal DNA in the Gymnosperm *Gnetum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 581-597.

Agarose disponível em www.google.com
<http://wwwbiol.paisley.ac.uk/courses/stfunmac/glossary/agarose.html>, 01.05.2005, 10. 10. 2006.

Anexos

Anexo I

Tabelas

Anexo I.

Tabela 1. Cronograma do Estágio

Actividades	Período em Meses								
	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Set	Out-Nov	Dez
Familiarização com aspectos de funcionamento do laboratório e revisão bibliográfica	■	■							
Manuseamento do espectrofotometro, e extracção de ADN de Tecido vegetal (<i>Vigna unguiculata</i>), de grãos de cereais e farinha de cereais		■							
Utilização de enzimas de restrição, noções práticas de PCR, extracção de ADN de sangue total, manchas e revisão bibliográfica			■						
Preparação de géis de agarose para ADN total e poliacrilamida para produto de PCR				■					
Extracção de ADN de sangue total, manchas e revisão bibliográfica					■				
Reciclagem de géis, tratamento de dados e revisão bibliográfica						■			
Revisão bibliográfica, e entrega da primeira versão do relatório							■		
Entrega da segunda versão do relatório								■	
Entrega e apresentação oral do relatório									■

Tabela 2. Concentração de agarose e alcance de resolução em pb

Agarose	
% de peso /Volume	Alcance de resolução em pb
2.0	100-5000
1.2	200 - 8000
0.8	400 - 20 000
0.3	1000 - 70 000

Tabela 3. Quantidades parciais de reagentes e o volume final do mix para análise dos STRs

Reagentes	Buffer 10X+Mgcl	10X Primers (P1+P2) +dNTPs	H ₂ O	Taq Polimerase	MIX	ADN
X ₁	2.5 µl	2.5 µl	16,7µl	0.8 µl	22.5µl	2.5µl
X ₁₇	42.5	42.5	283.9	13.6	-----	-----

Tabela 4: Protocolo de amplificação dos STRs

Locus STR	Temp.	Tempo	Ciclos
1°CSF1PO	96 °C	2'	1
	94 °C	1'	10
	60 °C	1'	
2°F13A01	70 °C	1,5'	20
3°F13B	90 °C	1'	
4°LPL	60 °C	1'	
5°HPRTB	70 °C	1,5'	
	4 °C	∞	∞

Tabela 5. Componentes e volume da solução "Stock" e do gel de poliácridamida.

Componentes da poliacrilamida	Quantidades	Elementos específicos do gel
Solução stock (acrilamida, piperasina e Tris- Hcl)	15 ml	15 ml
Tris- Hcl	100 ml	-
Acrilamida	8.55 g	-
Piperasina	0.45 g	-
Glicerol	1193.2 µl	1193.2 µl
TEMED	34.1 µl	34.1 µl
APS a 10%	85.2 µl	85.2 µl

Tabela 6. Quantidades de reagente e volume de reação para ITS 1.

Reagente	[Stock]	[Final]	V _{mix} (μl)	Mix (n+1)
ADN	100 ng/ μl	200 ng/ μl	5 μl	-
Tampão	10 X	1X	2.5 μl	22.5
dNTP ₃	10 mM	0.2 mM	0.5 μl	4.5
Mgcl ₂	50 mM	1.2 mM	0.6 μl	5.4
ITS _{forward}	10 μM	0.5 μM	1.25 μl	11.25
ITS _{reverse}	7 μM	0.5 μM	1.25 μl	11.25
Taq	5 U/ μl	0.04 U/ μl	0.2 μl	1.8
H ₂ O	-	-	13.7 μl	123.3
V _{reacção}	-	-	25 μl	-

Tabela 7. Digestão total por *EcoRI* do ADN amplificado para ITS1

Reagentes	Volume (μl)	Mix (μl)
Enzima (<i>EcoRI</i>)	0.5	5
H ₂ O	17	170
ADN	5	-
Buffer	2.5	25

Tabela 8. Digestão total por *Hind III* do ADN amplificado para ITS1

Reagentes	Volume (μl)	Mix (μl)
Enzima (<i>Hind III</i>)	0.5	5
H ₂ O	17	170
ADN	5	-
Buffer	2.5	25

Tabela 9. Digestão total por *BamHI* do ADN amplificado para ITS1

Reagentes	Volume (μl)	Mix (μl)
Enzima (<i>BamHI</i>)	0.5	5
H ₂ O	17	170
ADN	5	-
Buffer	2.5	25

Tabela 10: Protocolo de amplificação do ITS1

Região	Temp.	Tempo	Ciclos
ITS1	95 °C	5'	1
	94 °C	30''	
	53 °C	1'	33
	72 °C	1'	
	72 °C	10'	1
	4 °C	∞	∞

Tabela 11. Polimorfismos ITS1 com RFLP por 3 enzimas diferentes

Amostra	Enzima	Número de bandas	~Peso molecular (pb)
14C	<i>HindIII</i>	1	872
14D	<i>HindIII</i>	1	872
14F	<i>HindIII</i>	3	xxx
14G	<i>HindIII</i>	1	872
14I	<i>HindIII</i>	2	xx
14C	<i>BamHI</i>	1	872
14D	<i>BamHI</i>	1	872
14F	<i>BamHI</i>	3	xxx
14G	<i>BamHI</i>	1	872
14I	<i>BamHI</i>	-	--
14C	<i>EcoRI</i>	1	872
14D	<i>EcoRI</i>	1	872
14F	<i>EcoRI</i>	1	872
14G	<i>EcoRI</i>	1	872
14I	<i>EcoRI</i>	1	872

Tabela 12. Dados de quantificação espectrofométrica do ADN

Amostras	[µg/ml]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ / A ₂₈₀
1	166.8448	0.167	0.091	1.8364
2	340.7459	0.341	0.179	1.9084
3	209.6250	0.210	0.114	1.8421
4	285.2888	0,306	0.137	1.9284
5	306,4670	0.306	0.137	2.2441
6	356.2200	0.356	0164	2.1670
7	3385.5002	0.386	0.178	2.1648
8	450.8071	0.451	0.204	2.2136
9	515.4500	0.512	0.226	2.2833 (*)
10	439.5192	0.440	0.200	2.1990
11	277.8010	0.278	0.142	1.9497
12	249.7022	0.250	0.112	2.2289
13	237.3512	0.237	0.119	1.9996
14	465.2789	0.465	0.212	2.1998
15	278.4431	0.278	0.130	2.1394
16	394.5920	0.395	0.180	2.1024
17	291.9769	0.292	0.128	2.2886 (*)
18	370.3809	0.370	0.175	2.1193
19	261.1601	0.261	0.120	2.1737
20	322.4509	0.322	0.151	2.1341
21	106.9880	0.107	0.045	2.3977 (*)
22	526.8099	0.527	0.224	2.3484 (*)
23	535.9869	0.536	0.241	2.2235
24	414.7828	0.415	0.184	2.2510 (*)
25	425.5588	0.426	0.184	2.3176 (*)
26	231.6971	0.232	0.099	2.3305 (*)

Tabela 13. Componentes reacionais para detecção de OGMs

Reagente	Stock	[Final]	V _{inicial} (µl)	V _{final} (µl)	V.reação
Buffer	10x	1x	2.5	15	25 µl
Mgcl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75	4.5	
dNTPs	10 mM	0.1 mM	0.25	1.5	
P ₁	10 µM	0.25 µM	0.625	3.75	
P ₂	10 µM	0.25 µM	0.625	3.75	
Taq	5 U/µl	0.04 U/µl	0.2	1.2	
H ₂ O	-	-	15.05	90.3	
ADN	-	-	5	-	

Tabela 14: Protocolo de amplificação da região CaMV 35S

Região	Temp.	Tempo	Ciclos
CaMV 35S	94 °C	3'	10
	94 °C	1'	
	67 °C	1'	
	72 °C	1'	
	94 °C	1'	25
	62 °C	1'	
	72 °C	1'	
	72 °C	10'	

Anexo II

Métodos de Extração do ADN Ensaaiados Durante o Período do Estágio

Anexo II.

II. Métodos de Extração do ADN Ensaiados Durante o Período do Estágio

II.1. Método de Extração de ADN do Sangue Total

Para a extração de ADN do sangue total foi aplicado o método orgânico Fenol: clorofórmio: álcool-isoamílico, que consistiu no processo que se segue. As alíquotas de 700 µl previamente feitas foram descongeladas a 37 °C por 2 minutos e centrifugadas durante 2 minutos a 13 000 rpm. Depois da centrifugação extraiu-se o sobrenadante com auxílio de pipeta e deixou-se um pouco do sangue acima do "pellet" (aproximadamente 100 µl) e de seguida, resuspendeu-se o "pellet" de leucócitos em 800 µl de Tampão B.

Depois de Ressuspendido o "pellet", dividiu-se em 2 tubos de centrifuga eppendorf (450 µl cada), acrescentou-se 25 µl de SDS a 20 % e misturou-se bem por inversão, a seguir adicionou-se 6 µl de proteinase K (20 mg/ml) e posteriormente, incubou-se em banho-maria a 60 °C por uma hora.

Em seguida, fez-se "Spin" para levar todo o líquido ao fundo do tubo, acrescentou-se 80 µl de cloreto de sódio (5 M) e agregou-se um volume de 500 µl de fenol: clorofórmio álcool - isoamílico (25:24:1) e misturou-se bem por inversão. Centrifugou-se por 10 minutos entre (12 500-14 000) rpm, e no fim da centrifugação, com auxílio de uma pipeta recolheu-se o sobrenadante e passou-se para outro tubo, e repetiu-se o processo fenol: clorofórmio álcool isoamílico, e voltou-se a centrifugar nas condições anteriores. De seguida, agregou-se 1 ml de etanol absoluto a -20 °C, misturou-se bem por inversão e a fita do ADN apareceu rapidamente. Centrifugou-se por 2 a 3 minutos a 12 500-14 000 rpm e retirou-se o etanol por decantação, resuspendeu-se em 100 µl de água diionizada e deixou-se em banho maria a 55 °C toda a noite. No dia seguinte fez-se "Spin" e guardou-se o ADN a 4 °C (John *et al.*, 1991, Valverde *et al.*, 1993).

II.2. Método de Extração de ADN em Manchas de Fluido Orgânico Humano (Sangue)

Para extrair ADN através deste método, cortou-se 1 cm² de tecido na matriz sólida (papel whatman) contendo a mancha em pedaços de aproximadamente 2 mm de lado e depositou-se em tubos de centrifuga eppendorf de 1.5 ml. Suspenderam-se os pedaços em 500 µl de tampão DLB

e acrescentou-se 50 µl de SDS a 10 % e 5 µl de proteinase K (20 mg/ml). Incubou-se a 56 °C com agitação lenta por uma noite. No dia seguinte depositaram-se 20 µl de NaCl a 5 M e 575 µl de fenol: clorofórmio – álcool – isoamílico na proporção de 25: 24: 1 e misturou-se bem por inversão; de seguida centrifugou-se por 3 minutos a 12 000 rpm e passou-se a fase aquosa (fase superior) para outro tubo com auxílio de uma pipeta com ponta cortada em bisel. Feita a passagem, acrescentou-se 575 µl de clorofórmio – álcool – isoamílico e centrifugou-se nas condições referidas anteriormente. Terminada a centrifugação acrescentaram-se 1 ml de etanol a 96 % a -20 °C e guardou-se por 15 minutos a -80 °C e a seguir, centrifugou-se durante 15 minutos a 12 000 rpm. Terminado o período acima referido ressuspendeu-se o precipitado em 100 µl de água MILLIQ a 56 °C durante duas horas (John *et al.*, 1991, Valverde *et al.*, 1993).

II.3. Extracção de ADN de Tecidos Vegetais, Folhas de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata*), Farinha de Cereais (milho e soja) e Grãos de Leguminosas.

Na extracção de ADN a partir das folhas do feijão nhemba e de farinha dos cereais, será utilizada a metodologia descrita a seguir. Para a extracção do ADN de qualidade, utilizando folhas de feijão Nhemba e farinha de cereais, as metodologias por abordar sofrerão algumas modificações com o intuito de se extrair um ADN de qualidade para o estudo pretendido.

(i). Método de Extracção de ADN de Folhas de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata*)

Mediu-se o material vegetal na balança electrónica e o dado foi anotado. Pulverizou-se o material com quartzo no almofariz previamente congelado a -20 °C e adicionou-se-lhe tampão de extracção a p^H 7.8 a 8.0 (2:1, v: v) e SDS (a concentração final de 2 %) e misturou-se; passou-se a mistura para tubos de centrifuga de 12 ml e incubou-se a 60 °C durante 30 minutos. De seguida, centrifugou-se com refrigeração a 5 000 rpm por 20 minutos a 4 °C com finalidade de sedimentar o quartzo. Mediu-se e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo; adiciona-se 7 ml de solução A em cada 10 ml da mistura e põe-se a 4 °C durante 30 minutos. Volta-se a centrifugar a 5 000 rpm a 4 °C por 30 minutos. Recolhe-se o sobrenadante para um novo tubo medindo o volume com uma proveta graduada; seguidamente adiciona-se lentamente isopropanol (0.6 volumes por cada volume de sobrenadante recolhido), fecha-se com parafilme e agita-se lentamente invertendo o tubo. Conserva-se por uma noite a -20 °C. No dia seguinte, centrifuga-se

a 5 000 rpm por 15 minutos e recupera-se o "pellet" com auxílio de uma espátula e coloca-se num tubo de centrifuga eppendorf de 1.5-2 ml. Em seguida, seca-se e solubiliza-se com 600 µl de SSC (0,1 X) (p^H 7.5). Uma vez o material solubilizado trata-se com RNAse (10 mg/ml) durante 2 horas a 37 °C e adiciona-se 600 µl de clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) e agita-se lentamente por 10 minutos. Passados os 10 minutos centrifuga-se a 14 000 rpm durante 10 minutos e de seguida recupera-se a fase superior registando-se o volume e adiciona-se 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M p^H 5.2 e 0.6 volumes de isopropanol conservado a -20 °C. Agita-se lentamente a mistura. Depois da agitação centrifuga-se a 14 000 rpm por 10 minutos. O "pellet" é recuperado e solubilizado em 100 µl de água destilada e estéril (Della Porta *et al.*, 1983).

(ii). Método de Extração de ADN de Farinha de Cereais e Leguminosas (milho e soja)

Pesa-se a farinha e coloca-se em tubos de centrifuga eppendorf de 1,5 a 2 ml. Adiciona-se 700 µl de tampão de extração e 70 µl de SDS 20 % a farinha e, incuba-se por 10 minutos a 65 °C. Adiciona-se 200 µl de acetato de potássio a 5 M e faz-se "vortex" as amostras, coloca-se no gelo por 10 minutos.

Centrifuga-se a mistura a 12 000 rpm por 10 minutos a 4 °C e recupera-se 400 µl do sobrenadante e coloca-se num novo tubo. Adiciona-se um volume de clorofórmio: álcool isoamílico, centrifuga-se a 12 000 rpm por 10 minutos a 4 °C, recupera-se o sobrenadante medindo-se o volume.

Adiciona-se um volume de isopropanol, faz-se "vortex" e centrifuga-se a 2 000 rpm por 10 minutos a 4 °C; seguidamente, descarta-se o sobrenadante e lava-se o "pellet" com etanol a 70 % (100 µl); agita-se a mão e centrifuga-se nas condições anteriores. Seca-se o "pellet" e ressuspende-se em 50 µl de água diionizada (Della Porta *et al.*, 1983).

II.4. Método de Extração de ADN de Grãos de Cereais e Leguminosas

Para a extração do ADN de grãos de cereais e leguminosas foi utilizado o método desenvolvido por KANG *et al* (1998), (CTAB 2 % modificado de Doyle e Doyle, 1987).

Inicialmente remove-se a casca (tegumento) e corta-se o grão (semente) pela metade e coloca-se num tubo de centrifuga eppendorf de 1.5 ml e adiciona-se 400 µl do tampão de extração com 50 µg de proteinase K (20 mg/ml) e incuba-se a 37 °C por uma hora. Com ajuda de um triturador

“glass rod” tritura-se o grão (semente) no tampão e adiciona-se o tampão CTAB a 2 %; e 400 µl de clorofórmio álcool – isoamílico (24:1) contendo 5 % de fenol e centrifuga-se a 12 000 rpm numa centrifuga refrigerada a 4 °C por 10 minutos. Em seguida transfere-se o sobrenadante para novos tubos estimando-se o volume e adiciona-se 2/3 do volume de isopropanol e incuba-se os tubos a temperatura ambiente por 10 minutos para precipitar o ADN. Centrifuga-se a 12 000 rpm por 5 minutos e remove-se o sobrenadante, em seguida lava-se o “pellet” com etanol a 70 % e centrifuga-se nas condições anteriores, o que culminara com a remoção do etanol, secagem ao ar, ressuspensão do “pellet” em 50 µl de água bidestilada e estéril. Adiciona-se 1 µl de RNase para a remoção do ARN.

Anexo III

Amostragem

Anexo III

III. Amostragem

III.1. Amostragem do Sangue Total e em Manchas

As amostras de sangue humano foram colhidas no Laboratório do Hospital Central de Maputo e Hospital Militar em Maputo, em pessoas saudáveis. Em cada pessoa foram extraídos 3 mililitros de sangue venoso conservados em tubos de vácuo contendo o anticoagulante EDTA.

A recolha do sangue foi feita com prévia autorização das pessoas dadoras. Por cada amostra de sangue total colhida foram feitas aliquotas de 700 µl e conservadas a temperatura de -20 °C até ao momento da extracção do ADN. Para as amostras de manchas foram utilizados 150 µl do sangue para fazer manchas em papel de filtro Whatman de aproximadamente, dois centímetros de diâmetro e conservadas à temperatura ambiente (Locadena, 2001).

III.2. Amostragem do Material Vegetal

As amostras de cereais e leguminosas, em forma de farinha e grão que foram aplicadas para a testagem da presença de modificação genética, foram cedidas pela Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal. Estes cereais e leguminosas vieram de várias instituições e locais de Moçambique. Por seu turno as amostras para a análise dos ecótipos de *Vigna unguiculata* de Moçambique foram cedidas pela ex - INIA e pela Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal.

III. 2.1. Relação das amostras de feijão nhemba (*Vigna unguiculata*) de Moçambique e fonte doadora (para estudo do ITS).

Número de amostras	Código de análise molecular	Doador	Local de colecção
1	14C	FAEF	Inhaca
2	14D	FAEF	Inhaca
3	14F	FAEF	Inhaca
4	14G	FAEF	Inhaca
5	14I	FAEF	Inhaca
6	19B	FAEF	Inhaca
7	73B	FAEF	Inhaca
8	36A	FAEF	Inhaca
9	36D	INIA	-
10	67B	INIA	-
11	71D	INIA	-
12	71E	INIA	-
13	71G	INIA	-
14	IN 14	INIA	-
15	IN 15	INIA	-
16	IN16	INIA	-
17	IN 17		
18	IN 18	INIA	-
19	IN 19	INIA	-

III. 3. Amostras testadas a presença de modificação genética.

Produto	Descrição	Origem	Local	Resultado MG
Milho				
Milho branco	farinha	PMA, INGC/IMVF	Inhassoro	Negativo
Milho branco	farinha	INGC (Governo)	Mabote	Negativo
Milho branco	farinha	-	Guija (2)	Negativo
Milho branco	grão	INGC, PMA/IMVF	Inhassoro	Negativo
Milho branco	grão	PMA/JAMO	Chicualacuala	Negativo
Milho branco	grão	PMA	Mabote	Negativo
Milho vermelho	grão	Brasil DSV	-	Negativo
Milho branco	grão	Samaritano	Guija (1)	Negativo
Milho branco	grão	World Relief	Inhambane	Negativo
Milho branco	grão	-	Tete (Angonia) e Xai-Xai	Negativo
Milho branco	grão	Nacional	Guija	Negativo
Milho branco	grão	Importação	Xai-Xai	Negativo
Milho branco	grão	-	-	Negativo
Milho para Zimbabwe	grão	RAS	Beira (13.01.060)	Posetivo
Feijão-frade				
Feijão	Grão	PMA/Samaritano	Chicualacuala	Negativo
Arroz				
Arroz	grão	PMA/Samaritano	Chicualacuala	Negativo
Arroz	grão	Paquistão	Guija (2)	Negativo
Arroz	grão	-	Nacala (14.02.06)	Negativo
Soja				
Soja	farinha	World Relief	Inhambane	Negativo
Soja	farinha	PMA/Samaritano	Chicualacuala	Negativo
Soja	grão	Brasil - DSV	-	Negativo
Soja	farinha	-	Guija (1)	Negativo

Continuação (Amostras testadas a presença de modificação genética).

Ervilha				
Ervilha (amarela)	Grão	PMA/IMVF	Inhassoro	Negativo
Ervilha	Grão	PMA/IMVF	Inhassoro	Negativo
Ervilha	Grão	Canada	Guija (1)	Negativo
Ervilha amarela processada	Grão	PMA	Mabote	Positivo
Ervilha	Grão	PMA	Mabote	Negativo
Ervilha amarela processada	Grão	PMA/Samaritano	Chicualacuala	Negativo
Ervilha	Grão	PMA/JAMO	Chicualacuala	Negativo
Ervilha	Grão	PMA/Samaritano	Chicualacuala	Negativo
Feijão manteiga				
Feijão manteiga	Grão	PMA/Samaritano	Chicualacuala	Negativo
Feijão manteiga	Grão	-	Guija	Negativo
Feijão manteiga	Grão	PMA/JAMO	Chicualacuala	Negativo
Feijão manteiga	Grão	Nacional	Xai-Xai	Negativo
Feijão manteiga	Grão	-	Guija (2)	Negativo

Anexo IV

Material Utilizado no Estágio

Anexo IV.

IV.1. Material Utilizado no Estágio

Termociclador (BIO-RAD)

Microcentrífuga (Eppendorf)

Centrífuga refrigerada (ALC 4239R)

Espectrofotometro (BIO-RAD Smartspec3000)

Aparelho de electroforese para gel de agarose (BIO-RAD)

Aparelho de electroforese para gel de poliacrilamida (Eps 3501 XL)

Gel bond

Micropipetas Eppendorf e Gilson

Balança electrónica (SARTORIUS)

Capa de fluxo laminar (LABAIRE)

Transiluminador (UV)

Gel document (BIO RAD)

Microondas (DEFY)

Minicycler™ (MJ Research)

Pontas de pipetas

Suporte para tubos Eppendorf

Espátula

Aliquotas de Sangue 700 µl

Manchas de sangue feitas em papel Whatman

Folhas de feijão Nhemba (*Vigna unguiculata*)

Grãos de Milho branco e vermelho, Arroz, Feijão Manteiga, Feijão-frade, Ervilha, Soja, Farinha de Milho e Soja.

Anexo V

Figuras

Anexo V

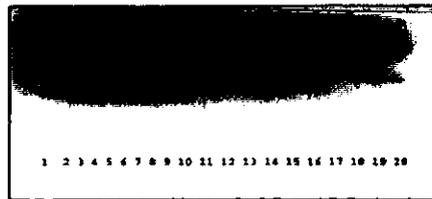


Figura 1. Primeiro gel de agarose antes da reciclagem

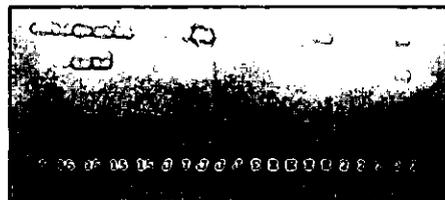


Figura 2. Primeira reciclagem do gel de agarose



Figura 3. Segunda reciclagem do gel de agarose

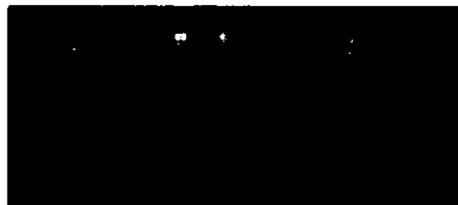


Figura 4. Terceira reciclagem do gel de agarose



Figura 5. ITS, amplificado mas não digerido.



Figura 6. Alelos do Locus CSF1PO, estudados por STR simplex

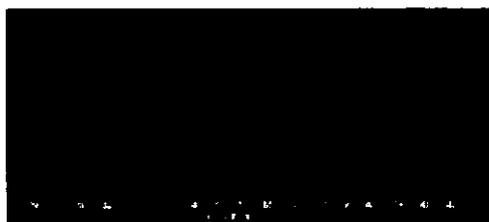


Figura 7. Alelos do Locus F13B, estudados por STR simplex



Figura 8. Alelos do Locus HPRTB, estudados por STR simplex

Anexo VI

**Algumas soluções usadas na
extracção de ADN e na
preparação de géis.**

Anexo VI

Algumas soluções usadas na extração de ADN e na preparação de géis.

Composição do tampão *stock* TAE concentrado 50X

Para 500 ml

Tris base	121 g
Ácido acético glacial	26.05 ml
EDTA (Adicionar água até fazer os 500 ml) 50 ml, 0.5 M (pH 8)	

Solução de Eléctrodo

Para 50 ml

Tris	0.76 g
Glicina	± 1.0 g
H ₂ O 48.24 ml [esta solução é válida para ambos os pólos, para o pólo positivo (ânodo) faz-se a tingção com azul de bromofenol, para o negativo (cátodo)].	

Tampão B (pH 8), 250 ml, para extração do ADN do sangue total

Tris-Hcl	50 mM (1,52g)
Nacl	150 mM (2,2g)
EDTA 100 mM (9,3 g, se Pm: 372,2 se Pm: 292,25 pesar 7,3 g)	

Tampão DLB para extração de ADN de manchas de fluidos orgânicos Humanos

Tris/Hcl	1 M (pH 7), 410 ml
Nacl	5 M, 2ml
EDTA	5 M, 20 ml
Água	968 ml

Tampão de extração de AND de folhas de *Vigna unguiculata*

Tris- (hidroximetil) metilamina Hcl,	100 mM
Cloreto de sódio (Nacl)	500 nM

Ácido Etileno-Diamino – Tetraacético (EDTA)	5mM
B-Mercaptoetanol	10 mM

Solução A

Acetato de potássio (5 M)	60 ml
Ácido acético	11,5 ml
Água destilada	28,5 ml

Tampão de extracção de ADN de grãos de cereais (50 ml)

Tris-Hcl (pH 8)	200mM
Nacl (cloreto de sódio)	200 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5 %

Tampão de carregamento (GLB)

Glicerol	3 ml
Azul de Bromofenol	25 mg
Água Milliq	7 ml

Solução CTAB 2%	(20 ml)
Tris-Hcl (pH 8)	100 mM
EDTA	20 mM
Nacl	14 M
PVP	1%(Mr=40)